

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR L'ÉTAT DES ESTERS DU CHOLESTÉROL ET DES PHOSPHATIDES DANS LE SÉRUM SANGUIN ÉTUDE SUR L'HOMOGENÉITÉ DES CÉNAPSES PHOSPHATIDOSTÉRIDOPROTÉIDIQUES PAR ULTRACENTRIFUGATION ET PAR ÉLECTROPHORÈSE (*)

par M. MACHEBOEUF, J.-L. DELSAL, P. LÉPINE et J. GIUNTINI.

En 1928, l'un de nous [1] est parvenu à isoler du sérum sanguin de Cheval une fraction des albumines extrêmement riche en phosphatides et en esters de cholestéryl. Malgré sa très haute teneur en substances lipoidiques, cette fraction est très soluble dans l'eau en milieu neutre et ses solutions aqueuses ne livrent pas leurs lipides à des solvants tels que l'éther et la ligroïne. Si l'on pratique des précipitations fractionnées en faisant varier progressivement le pH ou la teneur en sels, on ne parvient pas à subdiviser la fraction en des parties distinctes, car elle se comporte comme le ferait une matière homogène. Ce travail déjà ancien fut la première démonstration de l'existence d'associations entre lipides et protéides. Une série de recherches sur la nature et la stabilité des liaisons entre protéides et lipides fut effectuée depuis lors dans notre laboratoire [2] et ces recherches étendues par de nom-

(*) Communication présentée à la séance du 10 juin 1943 de l'Association des Microbiologistes de Langue Française.

breux auteurs ont fait admettre que les protéides ont la propriété de s'unir à des substances très diverses pour constituer des agrégats ou des combinaisons, les cénapses [3, 4], dont le rôle biologique est important (enzymes, antigènes, etc...). Ces cénapses sont généralement fragiles et leur isolement par les méthodes habituelles de la chimie se heurte à de grandes difficultés. La séparation de cénapses phosphatido-stérido-protéidiques du sérum de Cheval, citée ci-dessus, montre cependant qu'il est parfois possible d'obtenir des fractions suffisamment riches pour qu'une étude précise soit possible. La fraction obtenue par la méthode originale de Macheboeuf [4] contient trois types de constituants : 1° un protéide qui est une albumine semblable à la sérumalbumine ordinaire de Cheval ; 2° des esters de cholestéryl et 3° des phospho-amino-lipides.

Si l'on veut arracher les lipides et les séparer de l'albumine à laquelle ils sont liés, il faut dénaturer celle-ci ou, tout au moins, la déshydrater profondément par de l'alcool absolu avant de la soumettre à des épuisements par de l'éther anhydre (1). Rien ne permettait jusqu'alors de savoir si, dans la fraction étudiée, phosphatide, stérine et protéide formaient une seule cénapse à trois constituants ou si l'on avait affaire à un mélange de cénapse phosphatido-protéidique et de cénapse stérido-protéidique indépendantes, rassemblées en une même fraction par suite de caractères de solubilité voisins. Aucun fractionnement n'avait permis jusqu'ici de séparer deux tels constituants, mais on sait combien il est difficile de séparer des substances protéidiques voisines. Nous avons pensé que si stérines et phosphatides n'étaient pas les constituants d'une même cénapse, on pourrait peut-être déceler une hétérogénéité dans la fraction étudiée en la soumettant soit à l'ultracentrifugation, soit à l'électrophorèse différentielle. Nous allons voir que ces deux méthodes ne peuvent pas plus que les précipitations fractionnées aux divers pH séparer le cholestérol et les phosphatides qui cheminent à des vitesses identiques, aussi bien sous l'action d'un champ de gravitation que sous l'influence d'un champ électrique.

OBTENTION DE LA FRACTION DE CÉNAPSES ÉTUDIÉE.

Nous avons préparé la fraction par la méthode simplifiée de Macheboeuf et Dizerbo [5] : le sérum de Cheval est débarrassé des globulines par addition d'un égal volume d'une solution saturée et neutralisée de sulfate d'ammonium. La solution des albumines

(1) Il existe dans le sérum d'autres cénapses lipidoprotéidiques, car la fraction étudiée ici ne contient pas plus du 1/5 des lipides totaux du sérum. Certaines des cénapses du sérum sont moins stables et se laissent plus facilement arracher les lipides.

est additionnée de sulfate d'ammonium jusqu'à apparition d'un louche persistant à l'agitation, puis acidifiée jusqu'à ce que le pH atteigne 3,9. Le précipité formé dans ces conditions contient la totalité des albumines et des cénapses lipidoprotéïdiques correspondantes (Machebœuf [1]). Ce précipité est soumis à une série de traitements méthodiques par des quantités déterminées d'eau distillée. A chaque opération, la quantité d'eau est beaucoup trop faible pour dissoudre la totalité des albumines. Chaque fois donc l'action de l'eau opère un fractionnement, puisque les fractions les plus solubles sont dissoutes en proportions plus élevées que les cénapses qui sont peu solubles à pH 3,9. Après 5 opérations bien conduites, la partie restée non-dissoute est constituée en majeure partie par des cénapses du type de celles que Machebœuf avait isolées autrefois par une méthode plus compliquée. Il reste évidemment dans la fraction de petites quantités d'albumines libres, mais la teneur en phosphatides et en stérides est déjà considérable et les propriétés de l'ensemble rappellent en tous points celles des cénapses plus purifiées que l'on peut obtenir par la méthode originelle. La fraction obtenue est mise en suspension dans un peu d'eau, puis on ajoute la petite quantité d'ammoniaque diluée nécessaire pour amener le pH à 7 ; tout se dissout rapidement. La solution est prête à servir aux expériences (2).

ULTRACENTRIFUGATION.

Nous avons utilisé l'ultracentrifugeur de Henriot et Huguenard modifié par P. Lépine [6]. Le rotor renferme dans un portetube spécial 6 cellules en duraluminium, ayant chacune 3 cavités capillaires cylindriques parallèles dont le diamètre est de 2 mm. et la longueur de 21 mm., avec une capacité de 0,07 c. c. par tube capillaire, soit un volume total de 0,21 c. c. par cellule, donc 1,26 c. c. pour l'ensemble des liquides contenus dans le rotor.

Toutes les centrifugations ont été uniformément pratiquées à la vitesse constante de 79.000 tours par minute et à la température

(2) Notons qu'à l'heure actuelle les chevaux amenés aux abattoirs sont tous très sous-alimentés, par suite des restrictions en avoine et en fourrage. Leurs sérums ne sont pas normaux et les quantités de cénapses obtenues sont très inférieures à celles fournies par les expériences antérieures à la guerre. Comme la solubilité des cénapses à pH 3,9 n'est pas nulle, on ne peut donc pas poursuivre les lavages assez loin pour éliminer très bien les albumines libres. Nous avons même rencontré quelques sérums dans lesquels la quantité des cénapses était trop faible pour qu'il en reste encore non dissoutes après le quatrième lavage ; les chevaux dont provenaient ces sérums étaient dans un état de misère physiologique avancée.

de 24° C. Les autres valeurs des éléments constants entrant dans l'application de la formule d'Elford [7] étant : 1° distance de l'axe de rotation au ménisque de la cellule : $a = 0,75$ cm. ; 2° hauteur du prélèvement après centrifugation : $h = 0,70$ cm.

Dans une première série d'expériences, nous avons tout d'abord cherché à savoir si les 3 constituants présents dans nos préparations de cénapses : protéide, stérine et phosphatide, cheminaient de concert ou présentaient des vitesses de sédimentation différentes. Pour cela, nous avons opéré sur des solutions de concentrations suffisantes pour que nous puissions, par analyse chimique, suivre séparément la sédimentation de chacun des constituants (sans nous préoccuper du fait que dans ces solutions relativement concentrées les molécules ou particules se freinent mutuellement, ce qui occasionnerait une erreur notable si nous utilisions ces expériences pour calculer la constante de sédimentation ou la taille des particules).

Comme nos échantillons sont obligatoirement très petits, par suite des volumes des tubes du centrifugeur, comme, d'autre part, il nous fallait doser simultanément, dans chaque échantillon, l'albumine, le cholestérol et le phosphore lipidique, il fut nécessaire de mettre au point des techniques de microdosage permettant d'opérer avec précision sur de très faibles quantités de substances. Les techniques pour le dosage du cholestérol et du phosphore lipidique ont fait l'objet de notes préliminaires (Machebœuf et Delsal [8, 9]). Pour le dosage des protéides, nous avons opéré pondéralement : le coagulum obtenu par coagulation à chaud en milieu alcoolique (3), fut débarrassé des lipides par de l'alcool bouillant puis par de l'éther ; il fut ensuite desséché et pesé. L'opération est effectuée directement dans un petit tube conique de centrifugeur préalablement taré ; les protéides coagulés sont rassemblés par centrifugation, puis traités à trois reprises par de l'alcool bouillant et à deux reprises par de l'éther bouillant. Après chaque traitement par un solvant, les protéides coagulés sont rassemblés par centrifugation, puis le solvant est décanté. Le tube à centrifuger qui contient les protéides est finalement placé dans une étuve à 50°, puis dans une étuve à 100°, puis dans un dessiccateur à vide où il est maintenu jusqu'à poids constant. Les solutions alcooliques et étherées provenant de la délipidation

(3) La stabilité des cénapses vis-à-vis de l'alcool chaud est assez grande [4] et pour obtenir la coagulation totale des protéides, il faut additionner l'échantillon d'un volume assez grand d'alcool (5 c. c.), puis maintenir le mélange à une température voisine de l'ébullition de l'alcool pendant un temps assez long ; il est même avantageux de laisser refroidir après ce chauffage, puis de chauffer à nouveau après quelques heures. Tant qu'il reste des protéides non coagulés, la solution alcoolique surnageante est opalescente ; il faut répéter les chauffages jusqu'à ce que l'alcool soit parfaitement limpide.

des protéides sont rassemblées et soumises à la distillation sous pression réduite pour éliminer l'éther et une partie de l'alcool. La solution alcoolique résiduelle est divisée en deux parties dont la première sert au dosage du cholestérol [8], tandis que la deuxième sert au dosage du phosphore lipidique [9].

Afin d'opérer chaque dosage sur un échantillon suffisant, nous avons réuni les prélèvements effectués parallèlement sur les 6 cellules du centrifugeur. Dans chaque tube capillaire, nous avons effectué trois prélèvements, l'un correspondant au tiers supérieur du liquide, l'autre au moyen et le troisième au tiers inférieur. Après avoir réuni tous les prélèvements homologues, nous avons finalement obtenu trois échantillons que nous désignons par les termes « haut », « milieu » et « bas » qui furent pesés et analysés séparément. Voici les résultats obtenus dans une de nos trois expériences, exprimés en milligrammes par gramme de liquide.

TABLEAU I.

DURÉE de la centrifugation en heures (79.000 t./min.)	HAUT			MILIEU			BAS (1)		
	Albumine	Cholestérol	Phosphore lipidique	Albumine	Cholestérol	Phosphore lipidique	Albumine	Cholestérol	Phosphore lipidique
2	98	2,97	0,242	102	3,38	0,245	124	3,54	0,265
3	93	3,12	0,227	92	3,48	0,230	117	3,59	0,234
4	79	3,00	0,215	85	3,27	0,230	128	3,61	0,255

(1) L'augmentation de concentration dans le fond des tubes capillaires pendant l'ultra-centrifugation finit par être assez importante pour que la viscosité s'élève de telle sorte que le prélèvement de l'échantillon « bas » soit difficile et sujet à une erreur par défaut (il finit même par se rassembler une sorte de culot gluant).

Le but principal de cette partie de notre étude était de savoir si une différence existait entre les vitesses de sédimentation du cholestérol et des phosphatides ; nous avons donc, pour chaque échantillon, calculé le rapport cholestérol/phosphore lipidique ; les chiffres obtenus sont rassemblés dans le tableau II.

TABLEAU II.

DURÉE de centrifugation	RAPPORT Cholestérol/Phosphore lipidique		
	Haut	Milieu	Bas
—	—	—	—
2 heures	12,2	13,8	13,3
3 heures	13,7	15,1	15,3
4 heures	14,0	14,2	14,1

Rapport déterminé au préalable sur la solution non centrifugée : 12,7.

Le rapport cholestérol/phosphore lipidique est donc remarquablement constant ; toutes les valeurs trouvées sont identiques, aux erreurs expérimentales près. Il est même à noter que les techniques micro-analytiques qui nous ont servi sont très fidèles car, malgré la petitesse des échantillons analysés et bien qu'il s'agisse d'un quotient de deux chiffres expérimentaux, nous ne trouvons pas d'écart supérieur à 11 p. 100 par rapport à la moyenne générale.

Nous pouvons donc conclure que les phosphatides et les esters de cholestéryl cheminent de concert sous l'influence de la centrifugation ; leurs vitesses de sédimentation sont identiques ; tout se passe comme si phosphatide et stérine faisaient partie d'un même agrégat.

Ce fait était le seul que nous cherchions à préciser ou à infirmer dans cette première partie du travail, mais nous pouvons tirer de nos expériences quelques autres conclusions :

1° Le rapport entre lipides et protéides n'est pas parfaitement constant, car, comme il fallait le prévoir, il existe dans la fraction étudiée de petites quantités d'albumines libres, non chargées de lipides, que nos lavages n'avaient pas éliminées (voir ci-dessus). Ces protéides libres ne se sédimentent pas à la même vitesse que les cénapses.

2° Malgré leur haute teneur en lipides, les particules de cénapses sont dirigées par ultracentrifugation vers la partie inférieure du liquide, elles ont donc une densité supérieure à celle de l'eau et leur vitesse de sédimentation n'est pas d'un ordre de grandeur très différent de celle des albumines libres. Ce fait suffirait à démontrer, s'il en était encore besoin, que les lipides ne sont pas simplement à l'état de particules émulsionnées indépendantes des protéides, car, dans ce cas, ils se comporteraient très différemment.

ESTIMATION DE LA TAILLE DES PARTICULES ET DE LA CONSTANCE DE SÉDIMENTATION DES CÉNAPSES.

Rappelons que la méthode consiste à apprécier, dans des conditions données, les variations de concentration d'une substance, soit le coefficient C_t/C_0 , rapport de la concentration terminale à la concentration originelle, en fonction des temps de centrifugation. On peut choisir, pour apprécier la concentration des cénapses un élément aisément dosable, par exemple la teneur en protéides, ou la teneur en phosphore, ou celle en cholestérol du liquide centrifugé. Toutefois, comme dans les conditions où l'on opère, ils subsistent des causes d'erreur nombreuses (présence d'impuretés protéïdiques, mode de prélèvement, diffusion à l'arrêt, méthode analytique, etc...), il nous a paru légitime de faire porter les mesures non pas sur la variation de concentration d'un seul constituant, mais sur la valeur moyenne des variations de concentra-

tion pour les trois constituants dosés : cholestérol, phosphore lipidique et protéides (voir tableau III).

TABLEAU III.

<i>t</i> (minutes)	VALEUR DU RAPPORT C_t/C_0			MOYENNE
	Cholestérol	Phosphore	Protéides	
0	1	1	1	1
60	0,921		0,892	0,907
120	0,901	0,864	0,618	0,795
210	0,689	0,735	0,519	0,648
240	0,630	0,700	0,605	0,645

Prenant comme éléments pour les calculs les valeurs moyennes ainsi obtenues, l'application de la formule d'Elford conduit aux chiffres rassemblés dans le tableau IV, en tenant compte des données suivantes :

1° Les cénapses étant dissoutes dans de l'eau distillée, les valeurs de densité et de viscosité du milieu sont celles de ce liquide à la température de 24°.

2° La densité des particules des cénapses n'étant pas connue par des valeurs expérimentales, celle-ci a dû être déduite de leur composition chimique. Si l'on admet, à l'état sec, une proportion de 35,5 de protéides pour 18 de lipides [4], on peut être tenté d'admettre, d'après ces teneurs, une densité de 1,17, car les particules de protéides hydratés ont une densité moyenne de 1,3, tandis que les lipides ont une densité moyenne de 0,915. Mais, la densité de 1,17, ainsi calculée, est certainement erronée du fait de l'hydratation des molécules et elle ne doit être acceptée que comme un minimum. Si l'influence des lipides sur la densité était nulle, la densité de la particule hydratée serait celle de protéides, c'est-à-dire 1,3 ; ce chiffre est sûrement supérieur à la réalité. La valeur réelle de la densité doit se trouver, pensons-nous, entre les chiffres extrêmes 1,17 et 1,30. Les circonstances présentes ne nous ont pas permis d'appliquer à la détermination du poids spécifique des particules des cénapses hydratées la méthode des centrifugations comparées dans l'eau distillée et dans l'eau lourde [10] qui s'est montrée des plus précises lors d'autres recherches. Nous espérons qu'il nous sera un jour possible de combler cette lacune et nous indiquons dans le tableau IV les diamètres particuliers correspondant aux deux limites extrêmes admises pour la densité : 1,17 et 1,30.

Mais les valeurs de la constante de sédimentation tirées de ces expériences (qui étaient destinées, comme on l'a vu plus haut, à

TABLEAU IV.

t (minutes)	C_t/C	$\frac{1}{t} \log \frac{a+h}{a+h C_t/C_0}$	DIAMÈTRE EN (m μ)	
			Densité 1,17	Densité 1,30
60	0,907	0,000.332	4,3	3,2
120	0,795	0,000.377	4,5	3,4
210	0,648	0,000.385	4,6	3,4
240	0,645	0,000.340	4,3	3,2
Moyenne			4,4	3,3

apprécier par le dosage simultané de plusieurs des constituants des cénapses, le degré de liaison existant entre eux) sont manifestement trop faibles pour pouvoir être retenues. En effet, la concentration de la solution de cénapses employée dans ces essais est relativement élevée (par suite de leur trop grand nombre, les molécules ou particules se freinent mutuellement) et il ne saurait être question de sédimentation libre.

Nous avons donc repris ces essais en abaissant la teneur des solutions de cénapses à 2 p. 100 au maximum. Mais il nous était impossible alors de doser avec une précision convenable les teneurs en phosphore lipidique dans les très faibles volumes correspondant au tiers supérieur des cellules après centrifugation de deux, trois ou quatre heures à 80.000 tours minute. Nous avons pu, par contre, opérer encore avec une précision suffisante sur le cholestérol et les protéides. Nous avons ainsi obtenu les données résumées dans les tableaux V et VI.

TABLEAU V.

t (minutes)	CHOLESTÉROL (en gamma par gramme)	C_t/C_0	$\frac{1}{t} \log \frac{a+h}{a+h C_t/C_0}$	DIAMÈTRE EN (m μ)	
				Densité 1,17	Densité 1,30
0	476				
120	370	0,778	0,00044	4,7	3,6
180	282	0,593	0,00053	5,4	4,2
240	247	0,519	0,00048	5,1	3,9
Moyenne				5,1	3,9

On voit, d'après ces tableaux et en admettant que la densité des cénapses soit comprise entre 1,30 et 1,17, que la taille parti-

TABLEAU VI.

t (minutes)	PROTÉIDES (en milligrammes par gramme)	C_t/C_0	$\frac{1}{t} \log \frac{a+h}{a+h C_t/C_0}$	DIAMÈTRE (EN $m\mu$)	
				Densité 1,17	Densité 1,30
0	12,4				
120	8,0	0,647	0,00068	6,1	4,6
180	4,6	0,371	0,00087	6,9	5,2
240	3,4	0,274	0,00078	6,5	4,9
Moyenne				6,5	4,9

culaire des molécules serait de 4 à 5 $m\mu$, ou de 5 à 6,5 $m\mu$ suivant que l'on prend le cholestérol ou le protéide pour base d'appréciation, soit en résumé une taille particulière probable de 4 à 6,5 $m\mu$. Nous pensons que ces derniers chiffres fournissent une bonne approximation de l'ordre de grandeur des particules. Il va sans dire qu'il ne saurait être question que d'un ordre de grandeur et qu'il faut n'attacher à ces chiffres aucune valeur absolue. L'application de la formule d'Elford, comme de toutes les formules dérivées de la loi de Stokes, n'est strictement possible, en effet, que pour des particules sphériques (ce qui n'est vraisemblablement pas le cas des cénapses) et dont la densité doit être définie avec précision (alors que nous avons tenu compte de valeurs estimées).

Par contre, les valeurs possibles de la constante de sédimentation nous paraissent devoir être retenues avec une erreur relative de moindre importance, puisqu'elles sont indépendantes de la forme et de la densité des particules. En appliquant aux mêmes données que celles figurant dans les tableaux ci-dessus les calculs de la constante de sédimentation, on trouve pour cette dernière une valeur de $S_{20} = 2,5 \cdot 10^{-13}$ cm./sec./dyne avec les éléments du tableau V et de $S_{20} = 4 \cdot 10^{-13}$ cm./sec./dyne avec les éléments du tableau VI.

ELECTROPHORÈSE DIFFÉRENTIELLE (*).

Pour étudier la mobilité électrophorétique des divers constituants des cénapses, nous avons utilisé l'appareil décrit par Machebœuf [11] avec adaptation du système optique d'observa-

(*) Dans un travail préliminaire, Machebœuf et H. Vanaud [13] avec l'appareil primitif de Machebœuf [11], qui ne permettait pas le repérage optique des frontières, étaient parvenus à des résultats préliminaires superposables à ceux que nous rapportons ici.

tion des frontières de Machebœuf et Monnier [12] qui nous a donné satisfaction.

La solution de cénapses fut préalablement dialysée contre une solution de tampon à pH 7,45, obtenue par un mélange de phosphates sodiques en proportions convenables à la concentration moléculaire totale M/30. Ce même tampon servit à remplir les diverses parties de l'appareil à électrophorèse. Le gradient de potentiel dans le tube en U de l'appareil était de l'ordre de 3 à 4 volt/cm. Le déplacement de la frontière dans la branche positive du tube en U s'effectuait avec une vitesse approximative de 1,2 cm. à l'heure. Nous avons poursuivi l'expérience pendant huit heures trois quarts, si bien que le déplacement total de la fraction fut de 10,5 cm. La frontière de tête resta admirablement nette et l'on vit seulement s'en détacher une seule deuxième frontière, nette elle aussi, se déplaçant plus lentement. Le simple examen optique démontre l'existence de deux fractions dont l'une se déplace moins vite que l'autre. Nous avons prélevé dans le tube en U les parties suivantes : fraction I, entre la frontière de tête et la deuxième frontière, dans le tube positif ; fraction II, en arrière de la deuxième frontière dans le tube positif ; fraction III, plus en arrière encore, dans la partie inférieure du tube négatif ; fraction IV, portion voisine de la frontière terminale dans le tube négatif. Si la solution étudiée contenait deux fractions disséminables, la fraction I devait contenir uniquement de la plus rapide, tandis que la fraction IV ne devait contenir que de la plus lente. Les fractions II et III devaient être des mélanges.

Nous avons vérifié que les portions de solution tampon situées en avant de la frontière antérieure et en arrière de la frontière postérieure ne contenaient ni protéide, ni cholestérol, ni phosphatide. Voici les résultats en milligrammes par gramme de liquide obtenus par les analyses de 4 fractions définies ci-dessus :

TABLEAU VII.

FRACTIONS	ALBUMINE	CHOLESTÉROL	PHOSPHORE lipidique	RAPPORTS		
				Cholest./P.	P./Prot.	Cholest./Prot.
I	39,0	1,58	0,081	19,6	0,0020	0,040
II	41,8	1,48	0,076	19,4	0,0018	0,035
III	61,6	1,95	0,100	19,5	0,0016	0,031
IV	48,2	1,55	0,078	20,0	0,0016	0,032
Solution originale.				20,4	0,0015	0,031

Un fait remarquable se dégage immédiatement de ces chiffres : le rapport P./Cholest. est rigoureusement constant dans tous les cas. Donc la lécithine et les esters de cholestéryl cheminent de concert sous l'influence du champ électrique, comme ils cheminaient de concert sous l'influence de la force centrifuge. Phosphatide et cholestérol appartiennent donc à un même agrégat. La présence d'une fraction restant en arrière de la frontière principale ne correspond pas à l'existence d'une fraction contenant seulement du cholestérol ou seulement des phosphatides, toutes les fractions, même celle située en avant de cette deuxième frontière, contiennent phosphatides et stérines en proportions rigoureusement identiques. L'existence de la deuxième frontière décelé une hétérogénéité dans la fraction de cénapses étudiée, mais cette hétérogénéité n'est pas due à l'existence de cénapses de deux types distincts, l'un sans phosphatides, l'autre sans cholestérol. On constate que cholestérol et phosphatide s'accompagnent toujours en proportions rigoureusement égales. Nous ne pouvons pas, pour l'instant, donner avec certitude des renseignements sur la cause de l'hétérogénéité électrophorétique décelée par l'existence de deux frontières. D'ailleurs, il est très intéressant de noter qu'il existe seulement deux frontières et que chacune d'elles reste parfaitement nette. Nous ne sommes pas en présence d'un mélange constitué par une série de cénapses différentes présentant des mobilités s'échelonnant autour d'une valeur moyenne. Au contraire, chaque frontière reste parfaitement nette au cours de ses déplacements, comme si chacune correspondait à un type de cénapses ayant une mobilité bien définie et se comportant comme très homogène.

La fraction lente IV contient une proportion de protéides un peu plus élevée que la fraction rapide I ; ceci doit être dû aux petites quantités d'albumines libres qui souillent la fraction étudiée. La fraction lente n'est cependant pas constituée seulement par de petites quantités d'albumines, car, s'il en était ainsi, le rapport lipides/protéides serait très bas dans la fraction de queue n° IV, ce qui n'est pas le cas. Les petites quantités d'albumines libres présentes dans notre solution cheminent à la même vitesse que la fraction lente de cénapses et elles ne font pas apparaître de frontière particulière. Ceci explique que les auteurs qui ont jusqu'ici étudié les albumines par électrophorèse n'aient pas noté d'hétérogénéité nette due aux cénapses ; la mobilité de la majeure partie de ces cénapses est identique à celle des albumines libres. Ici nous opérons sur une solution où les cénapses sont dominantes par rapport aux albumines libres, la concentration en cénapses a pu être assez élevée pour que notre méthode très sensible d'observation optique décelé deux frontières, l'une correspondant à une fraction un peu plus rapide que les albumines, et l'autre correspondant aux albumines et aux cénapses qui ont la même mobilité que les albumines.

Dans la fraction rapide I, prélevée après électrophorèse entre la frontière rapide et la frontière lente, fraction la plus purifiée par conséquent, les teneurs en protéides, en phosphore et en cholestérol correspondent à 2,62 mg. d'ester de cholestéryl et 2,1 mg. de lécithine pour 39 mg. de protéides dans 1 c. c. de solution. Ceci correspond à 4 molécules de phosphatides et 8 molécules de stérides pour chaque molécule d'albumine, de poids moléculaire 69.000.

Notons qu'en période normale, lorsque l'on peut étudier des chevaux sains et alimentés normalement, on obtient des fractions de cénapses beaucoup plus riches en lipides et notre étude devra être reprise sur de telles fractions. Nous pouvons cependant conclure, dès maintenant, que dans les cénapses acidoprécipitables du sérum de Cheval du type isolé par Machebœuf en 1928, l'ester de cholestéryl et le phosphoaminolipide ne se séparent ni par ultracentrifugation, ni par électrophorèse, nous savions déjà que le fractionnement par variations de pH ne les sépare pas non plus. Tout semble donc démontrer qu'ester de cholestéryl et phosphoaminolipide sont liés à une même molécule d'albumine pour constituer une seule cénapse lécithostéridoprotéidique. Comme dans notre laboratoire, Tayeau [14] a pu constater que l'action simultanée de l'éther et d'un saponoside peut, dans certaines conditions, arracher au sérum la presque totalité de ses stérols, sans arracher les phosphatides, on peut penser que le cholestérol n'est pas un chaînon intermédiaire entre protéide et phosphatide. Il est par contre possible que le phosphatide soit directement uni au protéide et serve de trait d'union entre protéide et stéride. Il se peut également que stéride et phosphatide soient unis indépendamment l'un de l'autre, en des points différents de la molécule protéidique. Nous ne pouvons pas encore choisir entre ces deux hypothèses.

RÉSUMÉ.

Dans le sérum de Cheval [4], on a pu séparer des albumines, une fraction (peu soluble dans l'eau à pH 3,9, mais très soluble lorsque le pH s'élève au-dessus de 6,5) qui est très riche en esters de cholestéryl et en phosphoaminolipides. Cette fraction, connue sous le nom de cénapses acido-précipitables de Machebœuf, a été soumise à l'ultracentrifugation et à l'électrophorèse. Ni l'une ni l'autre de ces deux techniques n'a pu séparer les stérides d'avec les phosphatides qui se sédimentent ou se déplacent avec une même vitesse. Comme les tentatives de fractionnement par précipitation et dissolution avaient également failli à toute séparation des stérides et des phosphatides, on est conduit à conclure que phosphatide et stéride sont les constituants d'une même cénapse albumino-lécitho-stéridique. L'électrophorèse a cependant révélé que la fraction étudiée est un mélange de deux sous-fractions, de

mobilités inégales, chacune de ces sous-fractions se comporte comme homogène à l'électrophorèse. Ces deux sous-fractions ne diffèrent pas par leurs proportions relatives de phosphatides et de stérides car le rapport phosphore/stérol est le même. Elles diffèrent peut-être par la nature du phosphatide constituant (céphaline ou lécithine ou sphingomyéline) ou par la nature de l'acide gras qui estérifie le cholestérol, ou par la nature du protéide support. Ce problème est à l'étude dans notre laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MACHEBOEUF (M.). *Thèse Doctorat ès Sciences*, Paris, 1928 et *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1929, **11**, 268 et 485.
- [2] MACHEBOEUF (M.) et divers collaborateurs. Une série de mémoires in *Bull. Soc. Chim. Biol.* de 1931 à 1940 ; voir aussi confirmation récente par GORTER (E.) et HERMANS (J.). *Proc. Nederl. Akad. Van Wetensch.*, 1942, **45**, 804 et 808.
- [3] MACHEBOEUF (M.). Etat des lipides dans la matière vivante, les cénapses et leur importance biologique. 1 vol., Paris, 1936 (Hermann et C^{ie}, édit.) [*fascicule 448 des Actualités scientifiques et industrielles*].
- [4] MACHEBOEUF (M.). Réactivité des composés biologiques : Réactivité des protéides et son rôle dans de nombreux phénomènes biologiques. 1 vol., Paris, 1942 (Hermann et C^{ie}, édit.) [*fascicule 933 des Actualités scientifiques et industrielles*].
- [5] MACHEBOEUF (M.) et DIZERBO (L.). *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **132**, 268.
- [6] LÉPINE (P.). *J. Chim. Phys.*, 1942, **39**, 1.
- [7] Voir pour l'application de la formule d'ELFORD : LÉPINE (P.), NICOLLE (P.) et GIUNTINI (J.). *Ces Annales*, 1942, **68**, 503 et LÉPINE (P.). *Loc. cit.* [6].
- [8] MACHEBOEUF (M.) et DELSAL (J.-L.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1942, **24**, 296.
- [9] MACHEBOEUF (M.) et DELSAL (J.-L.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, **25**, 116.
- [10] LÉPINE (P.), LEVADITI (J.) et GIUNTINI (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1942, **214**, 568.
- [11] MACHEBOEUF (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 1241.
- [12] MACHEBOEUF (M.) et MONNIER (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1942, **214**, 1002 et *Ces Annales*, 1942, **68**, 488.
- [13] MACHEBOEUF (M.) et VANAUD (H.). *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **136**, 1249.
- [14] TAYEAU (F.). *C. R. Acad. Sci.*, 1941, **212**, 575.

**MÉTHODE SEMI-INDUSTRIELLE
DE CONCENTRATION ET DE PURIFICATION
DE LA TOXINE DIPHTÉRIQUE
EN VUE DE LA RÉCUPÉRATION DES TOXINES
DE FAIBLE TITRE**

par MARGUERITE FAURE.

*(Institut Pasteur. Service de Chimie biologique [D^r MACHEBOEUF]
et Service de la Diphtérie [D^r LAFFAILLE].)*

Il est d'observation courante, qu'au cours de la fabrication de la toxine diphtérique, certains lots de toxine se trouvent être inutilisables, leur taux de floculation s'abaissant à 10, 15, 20 unités, au lieu de 40, minimum nécessaire pour l'obtention d'une bonne anatoxine. Aussi, le service intéressé nous a-t-il demandé d'étudier et de mettre au point un procédé de concentration de ces toxines lui permettant de les récupérer.

La concentration par simple élimination de l'eau ne donnerait pas un produit satisfaisant, car il serait trop riche en substances autres que la toxine et provenant, en majeure partie, du milieu de culture. Il est donc nécessaire, non seulement de concentrer la solution contenant la toxine, mais encore de la purifier de façon à obtenir une préparation renfermant par unité de toxine une quantité d'impuretés au plus égale à la quantité d'impuretés contenues par unité dans une préparation normale. On ne demande donc à la méthode qu'une purification limitée de la toxine, purification poursuivie dans un but pratique bien déterminé : la récupération des toxines de titre trop faible. On ne recherche pas ici l'obtention d'une toxine pure.

Indépendamment de la question de purification, nous nous sommes attachée à obtenir un produit final de titre aussi élevé que possible afin de pouvoir l'utiliser, le cas échéant, pour enrichir des toxines de titre trop bas.

CHOIX DE LA MÉTHODE. — De nombreuses méthodes ont été utilisées pour purifier la toxine diphtérique. On peut les classer en 6 groupes : précipitation par les acides, précipitation par les solvants organiques, adsorption suivie d'élution, ultrafiltration, précipitation par les sels métalliques et relarguage par action de sel.

Nous avons écarté la première méthode qui dénature la toxine, ainsi que la deuxième qui conduit à un produit altéré si l'on n'opère pas à basse température, technique qui demande un appareillage qu'il serait difficile de réaliser actuellement. Les procédés basés sur des phénomènes d'adsorption et d'élution ne dénaturent pas la toxine, mais ils sont peu recommandables du point de vue pratique : d'une part, les techniques sont très délicates et peu fidèles du fait des variations de composition de la matière première ; d'autre part, elles ne sont réalisables qu'en milieu très dilué, ce qui exige la manipulation de grands volumes de liquides et de grandes masses d'adsorbant, et elles donnent un produit final également très dilué. L'ultrafiltration, elle non plus, ne modifie pas la toxine, mais, jusqu'à présent, l'utilisation de cette technique n'a guère été étendue au domaine pratique et, en particulier, il est difficile d'obtenir de bons rendements. La précipitation par les sels métalliques constitue une excellente méthode de purification dont la réalisation pratique est aisée. En particulier, on utilise couramment dans les pays anglo-saxons la précipitation de l'anatoxine diphtérique par l'alun de potassium pour préparer industriellement un vaccin qui, paraît-il, donne d'excellents résultats. Mais, sous l'action des sels métalliques, la toxine ou l'anatoxine ainsi séparées sont nettement modifiées : il se forme de véritables associations protéine-métal d'où il serait difficile de séparer la molécule initiale de toxine. Il est fort possible que ces complexes métalliques possèdent des propriétés biologiques intéressantes (au même titre que l'insuline-zinc, par exemple), mais, il serait bon, avant d'utiliser dans la pratique de telles préparations, de préciser la nature et le degré des modifications subies par la molécule de toxine et surtout d'étudier soigneusement ses propriétés immunologiques.

Il reste donc comme méthode pratique, actuellement applicable, le relarguage de la protéine-toxine par l'action d'une grande quantité d'un sel neutre d'un métal alcalin. A l'inverse de ce qui se produit avec les sels métalliques, les protéines précipitées par cette méthode, ne sont apparemment pas modifiées : après élimination du sel précipitant, on récupère les molécules initiales.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE. — La précipitation de la toxine diphtérique par le sulfate d'ammonium a été particulièrement bien étudiée. Si l'on ajoute à une solution de toxine une quantité de sulfate d'ammonium correspondant au tiers de la saturation, on n'insolubilise pas la toxine, mais on précipite des protéines bacillaires atoxiques. Par addition d'une nouvelle quantité de sulfate d'ammonium à cette solution privée de protéines bacillaires, on précipite intégralement la toxine lorsque la teneur en sel atteint les deux tiers de la saturation.

Cette méthode conduit à un produit très purifié lorsqu'on

l'applique à une toxine développée dans un milieu de culture qui, par lui-même, ne donne aucun précipité avec le sulfate d'ammonium dans ces conditions. Avec le milieu de culture utilisé par l'Institut Pasteur pour la production de la toxine diphtérique, les résultats sont beaucoup moins bons, car la toxine est accompagnée dans sa précipitation par une masse considérable de produits provenant du milieu de culture. Cependant, même dans ces conditions, la méthode permet une purification relative de la toxine, car on élimine des produits inactifs, d'une part, dans le précipité obtenu au tiers de saturation en sulfate d'ammonium et, d'autre part, dans la solution-mère du précipité contenant la toxine.

Nous avons donc tenté de mettre au point une méthode pratique de concentration et de purification des toxines de titre faible en nous basant sur ce principe et en utilisant un matériel aussi simple que possible. En voici le schéma :

Afin de réduire le volume de solution à traiter et de diminuer la consommation de sulfate d'ammonium, on commence par concentrer la toxine par simple élimination de l'eau. La toxine diphtérique étant très fragile, on neutralise sa solution, puis on effectue la concentration à basse température en distillant l'eau sous vide. On ajoute au concentrat du sulfate d'ammonium en quantité correspondant au tiers de saturation, de façon à éliminer par précipitation les protéines bacillaires atoxiques et des produits provenant du milieu de culture. En amenant ensuite la concentration de la solution précédente aux deux tiers de saturation en sulfate d'ammonium, on précipite la toxine avec d'autres produits venant du milieu de culture. Ce précipité étant imprégné de sulfate d'ammonium, on élimine ce sel par dialyse.

LA NEUTRALISATION. — Après développement du bacille diphtérique, le pH du milieu de culture qui renferme la toxine est généralement voisin de 8. Il est nécessaire, avant de concentrer, de neutraliser, afin de réduire au minimum les chances de dénaturation de la toxine. Cette opération très simple en apparence est en réalité très délicate, car le milieu est très fortement tamponné par des carbonates et des sels d'ammonium.

Si l'on se contente d'amener le pH de la solution à 7 par addition d'acide, la réaction obtenue n'est pas stable, car on a libéré de l'acide carbonique qui s'élimine lentement sous forme de gaz carbonique et le pH remonte au voisinage de 8. Pour décomposer rapidement la totalité des carbonates et des bicarbonates, il serait nécessaire d'abaisser le pH de la solution au-dessous de 6, ce qui dénaturerait la toxine. On est donc obligé de ne les décomposer que partiellement et par fractions successives : en abaissant le pH vers 6,4, puis en chassant le gaz carbonique, on arrive, en recommençant l'opération plusieurs fois, à stabiliser la réaction au voisinage de la neutralité.

Mais l'acide carbonique n'est pas le seul élément instable du milieu ; les sels d'ammonium se dissocient également en libérant de l'ammoniaque qui est entraînée avec la vapeur d'eau au cours de la concentration. En effet, on constate que, tandis que l'on recueille un distillat très nettement alcalin et contenant l'ion ammonium, la solution concentrée s'acidifie progressivement. Afin de réduire au minimum ce phénomène d'acidification, on décompose les carbonates par un acide faible et lui-même entraînable par la vapeur d'eau : l'acide acétique.

Dans la pratique, nous avons effectué la neutralisation en deux temps. Dans le premier temps, on amène le pH à 6,4 environ par addition d'acide acétique, puis, on entraîne l'acide carbonique libéré par un courant d'air ; le pH remonte lentement au-dessus de 7. Dans le deuxième temps, on abaisse à nouveau le pH à 6,4, puis on extrait le gaz carbonique sous le vide. En opérant ainsi, la solution de toxine est sensiblement neutre et sa réaction ne varie que faiblement au cours de la concentration. En effet, l'acidification de la solution par départ d'ammoniaque au cours de la distillation de l'eau est compensée par l'alcalinisation due à la décomposition des bicarbonates restant en carbonates sous l'action du vide. Les valeurs extrêmes que nous avons observées avant et après la concentration en utilisant ce procédé ont été 7,4 et 6,7, ce qui permet de concentrer la toxine sans la dénaturer.

LA CONCENTRATION. — La distillation de l'eau doit être faite à température aussi peu élevée que possible. A 40°, déjà, une partie de la toxine est détruite. En opérant au voisinage de 35°, on peut concentrer une solution de toxine sans perte d'activité, à condition que les variations du pH au cours de la distillation ne soient pas trop grandes. Il est donc nécessaire d'effectuer cette concentration dans un appareil pouvant fonctionner sous un vide de 73 à 74 cm. de mercure.

La solution de toxine mousse d'une manière considérable, ce qui rendrait impossible toute distillation de l'eau par ébullition et ce qui risquerait, de plus, de dénaturer la toxine. Nous avons empêché la formation de cette mousse en étendant à la surface de la solution une très faible couche d'alcool undécylique [ou à défaut, d'alcool laurique préalablement dissous dans de l'éther](1).

Plus on concentre la toxine, plus la quantité de sulfate d'ammonium qu'on devra utiliser pour la purifier sera faible, mais, on est limité dans cette concentration par la consistance de la solution obtenue. En effet, dans l'opération suivante, il faut avoir une

(1) Dans le cas présent où l'on distille de grands volumes d'eau, l'emploi de ces alcools supérieurs est préférable à celui de l'alcool octylique habituellement utilisé, car ils ne sont que très lentement entraînés par la vapeur d'eau.

solution qui soit encore suffisamment fluide pour que la séparation des précipités obtenus au tiers et aux deux tiers de saturation soit facile et que ces précipités ne soient pas trop souillés par des solutions-mères trop visqueuses. Les préparations de toxine renferment de 30 à 50 g. de matière sèche par litre (le plus souvent une quarantaine de grammes). Par tâtonnement, nous avons fixé à 1/7 le degré de concentration qui donne encore un résultat satisfaisant, même avec les lots de toxines les plus riches en matière sèche.

Nous avons vu plus haut que la réaction de la solution pouvait varier légèrement au cours de la concentration. Si le pH s'est abaissé, on le ramènera à la neutralité par addition d'ammoniaque; si, au contraire, il s'est élevé, on n'ajoutera pas d'acide avant la dissolution du sulfate d'ammonium qui, lui-même, est toujours un peu acide.

LA PRÉCIPITATION PAR LE SULFATE D'AMMONIUM. — a) *Précipitation des produits inactifs au tiers de saturation en sulfate d'ammonium.* — Si l'on ajoute à la solution de toxine du sulfate d'ammonium en quantité correspondant au tiers de la saturation, on ne précipite que des substances inactives, mais il ne faut pas dépasser cette concentration pour ne pas insolubiliser de toxine. Or, la solution de toxine concentrée au 1/7 de son volume initial renferme, en moyenne, 28 p. 1.000 de matière sèche de densité 1,4. Un litre de concentrat ne contient donc que 800 c. c. d'eau. Pour obtenir une solution au tiers de saturation en sulfate d'ammonium, il suffira donc de dissoudre 200 g. de sel par litre de solution concentrée [et non 250 g., chiffre théorique pour saturer au tiers 1 litre d'eau] (2). Nous avons vérifié expérimentalement avec des solutions concentrées ces calculs théoriques : si l'on ajoute une quantité de sulfate d'ammonium supérieure à 200 g. pour 1 litre de concentrat, on précipite une partie de la toxine.

Pratiquement, on réalise la dissolution du sulfate d'ammonium en brassant lentement la solution avec un agitateur mécanique tournant obliquement dans un large récipient (3). Le sulfate

(2) Les diverses préparations de toxine présentent des teneurs très variables en matière sèche : de 50 à 30 p. 1.000. Si le résidu sec de la solution initiale est de 50 p. 1.000, la solution concentrée au 1/7 ne renferme que 75 p. 100 d'eau. Il suffirait donc d'ajouter 187,5 g. de sulfate d'ammonium à cette solution pour atteindre le tiers de saturation. Inversement, si la toxine initiale ne renferme que 30 p. 1.000 de matière sèche, il serait théoriquement nécessaire d'ajouter à la solution concentrée 212,5 g. de sel pour obtenir le tiers de saturation. Ces chiffres sont trop voisins de 200 g., quantité calculée pour la moyenne des toxines, pour qu'il soit nécessaire, dans la pratique, de tenir compte des variations de la matière première.

(3) Ce dispositif permet une dissolution rapide et complète du sel,

d'ammonium étant toujours un peu acide, on neutralise la solution par addition d'ammoniaque.

L'importance et l'aspect du précipité obtenu sont très variables suivant les lots de toxine traités. Comme ce précipité est souvent très fin et assez difficile à filtrer, on le laisse déposer, au moins partiellement, afin de faciliter la filtration de la solution surnageante que l'on décante par aspiration (4).

b) *Précipitation de la toxine aux deux tiers de saturation en sulfate d'ammonium.* — Si l'on ajoute au filtrat précédent 200 g. de sulfate d'ammonium, on obtient théoriquement une solution saturée aux deux tiers, mais le précipité formé dans ces conditions ne floccule pas ou très mal ; il reste en grande partie sous la forme d'une suspension stable dans la solution. Il est alors pratiquement impossible de le séparer par filtration et la centrifugation, elle-même, ne le rassemble que partiellement ; dans ces conditions les rendements en toxine sont très mauvais. C'est pourquoi nous avons ajouté un excès de sulfate d'ammonium [250 g. au lieu de 200 g. pour 1 litre de concentrat initial] (5). Le précipité floccule rapidement ; sa séparation est alors facile et le rendement en toxine est bien meilleur.

On dissout le sulfate d'ammonium, comme précédemment, par brassage mécanique en ayant soin de neutraliser la solution avec de l'ammoniaque au fur et à mesure de la dissolution du sel. On prolonge un peu le brassage de la solution (trente à quarante-cinq minutes) de façon à réunir la presque totalité du précipité en une masse collante qui, en partie, adhère aux parois du récipient et, en partie, s'étale à la surface du liquide et qu'il est alors très facile de recueillir (6). Il ne reste en suspension dans la solution qu'une très faible proportion du précipité qui se laisse très aisément recueillir par filtration sur un Buchner.

Comme on doit soumettre ce précipité à la dialyse, on le dissout dans un volume d'eau aussi faible que possible, de façon à ne pas avoir à utiliser des dialyseurs trop volumineux. En dissolvant

tandis que l'agitation mécanique d'un flacon, par exemple, contenant la solution et le sulfate d'ammonium donne un résultat beaucoup moins bon : la dissolution du sel est beaucoup plus lente (elle est même incomplète aux deux tiers de saturation) et il se forme une quantité importante de mousse qui gêne la séparation du précipité.

(4) La séparation de ce précipité est toujours possible par filtration sur Buchner : c'est ainsi que nous l'avons réalisée ; mais cette filtration serait très avantageusement remplacée par une centrifugation.

(5) Cet excès de sulfate d'ammonium entraîne la précipitation d'une plus grande quantité de substances inactives qui viennent souiller la toxine, mais ce supplément d'impuretés est éliminé en presque totalité au cours de la dialyse.

(6) Nous avons utilisé pour cette opération une terrine, forme de récipient qui permet une récolte particulièrement aisée du précipité.

le précipité dans un volume de solution correspondant au 1/50 du volume initial de la toxine dont il provient, on obtient, en général, un produit qui présente une fluidité satisfaisante.

LA DIALYSE. — La dialyse a pour but d'éliminer le sulfate d'ammonium contenu en abondance dans la solution précédente. En réalité, grâce au choix d'une membrane de porosité convenable, on arrive, sans perdre de toxine, à éliminer une proportion importante des substances inactives qui l'accompagnent. Cette dialyse constitue donc, par elle-même, une nouvelle étape de la purification de la toxine. Nous avons étudié la dialyse de cette solution parallèlement à travers des membranes de collodion, de viscose et de cellophane et nous avons choisi la viscose qui présente une porosité intermédiaire entre celle du collodion et celle de la cellophane. Tandis que le collodion, trop poreux, laisse passer lentement la toxine, la cellophane, trop peu perméable, ne se laisse traverser que par une faible proportion des substances qui souillent la toxine. La dialyse à travers une membrane de viscose permet, au contraire, d'éliminer, sans perte appréciable de toxine, près de la moitié des impuretés qui l'accompagnent dans le précipité obtenu aux deux tiers de saturation en sulfate d'ammonium.

Ces membranes de viscose se présentent industriellement sous la forme de boyaux, ce qui permet de monter facilement, sans appareillage spécial, des sacs dialyseurs en ligaturant chaque extrémité du boyau sur un bouchon de caoutchouc. Mais, du fait de la pression osmotique de la solution enfermée à l'intérieur du dialyseur, il s'exerce sur ses parois une forte pression qui tend à dilater le boyau et à expulser les bouchons qui obturent ses extrémités. Comme la viscose ne présente qu'une faible résistance mécanique à la pression à cause de sa grande élasticité lorsqu'elle est mouillée, nous avons renforcé cette résistance en enfermant chaque boyau dans un étui de toile (7). Afin d'éviter l'expulsion des bouchons, nous avons monté des bouchons coniques en plaçant leur plus grand diamètre vers l'intérieur du sac et leur plus petit diamètre vers l'extérieur. Enfin, nous avons maintenu solidement l'ensemble par deux ligatures passant au-dessus de l'étui de toile et serrant très fortement la viscose contre les bouchons de caoutchouc sur toute leur hauteur.

Nous avons utilisé dans ce travail des boyaux « Vico » (8) de

(7) Il faut choisir un tissu résistant et non élastique, mais il faut cependant éviter de prendre une toile trop épaisse et trop serrée qui ralentirait la diffusion des substances qui dialysent. On coud cette toile de façon à constituer un cylindre de même diamètre intérieur que le boyau de viscose. On arrête la couture à 1 cm. de l'extrémité de l'étui, ce qui facilite beaucoup son montage sur le bouchon.

(8) Boyaux « Vico » fabriqués par la Société de la Viscose française — Service Cap Viscose — 5 et 7, avenue Percier, Paris (VII^e).

40 cm. de long et 45 mm. de diamètre. Nous schématisons ci-contre le montage de l'un de ces dialyseurs.

Le dialyseur est constitué par un boyau en viscose (V), enfermé dans un étui cylindrique en toile (E). Il est fermé à son extrémité inférieure par un bouchon de caoutchouc plein (B. inf.) et à son extrémité supérieure par un bouchon de caoutchouc [B. sup.] (9) traversé par un tube de verre (T) par lequel on introduira la solu-

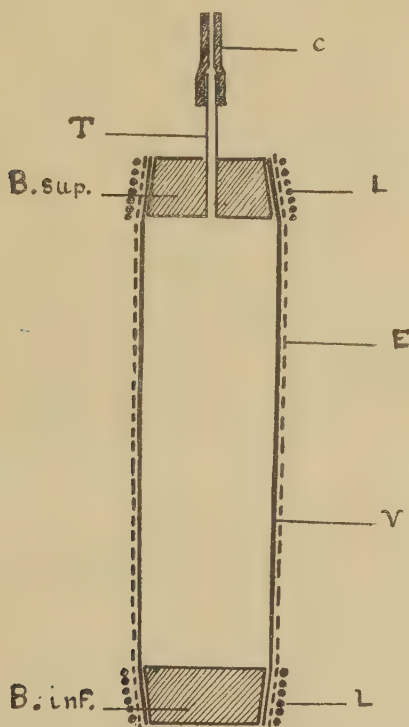


FIG. 1.

tion à dialyser. Ce tube de verre est garni d'un tube de caoutchouc (C) que l'on peut fermer à l'aide d'une pince à lames parallèles. Deux ligatures (L) fixent la viscose et la toile au niveau des bouchons.

Avant d'utiliser un dialyseur, on vérifie son étanchéité en le gonflant avec de l'air comprimé puis en l'immergeant dans l'eau; ensuite on le stérilise en le remplissant avec de l'eau formolée

(9) On utilise la moitié supérieure d'un bouchon n° 12 ou la moitié inférieure d'un bouchon n° 13.

à 3 p. 1.000 et en le laissant séjourner pendant au moins trois heures dans une solution formolée au même taux.

La solution contenant la toxine possède une pression osmotique considérable (une dizaine d'atmosphères) due, pour sa majeure partie, à la présence de sulfate d'ammonium. Comme le montage que nous avons réalisé ne pouvait pas résister à une pareille pression, nous avons utilisé l'artifice suivant : au lieu de remplir

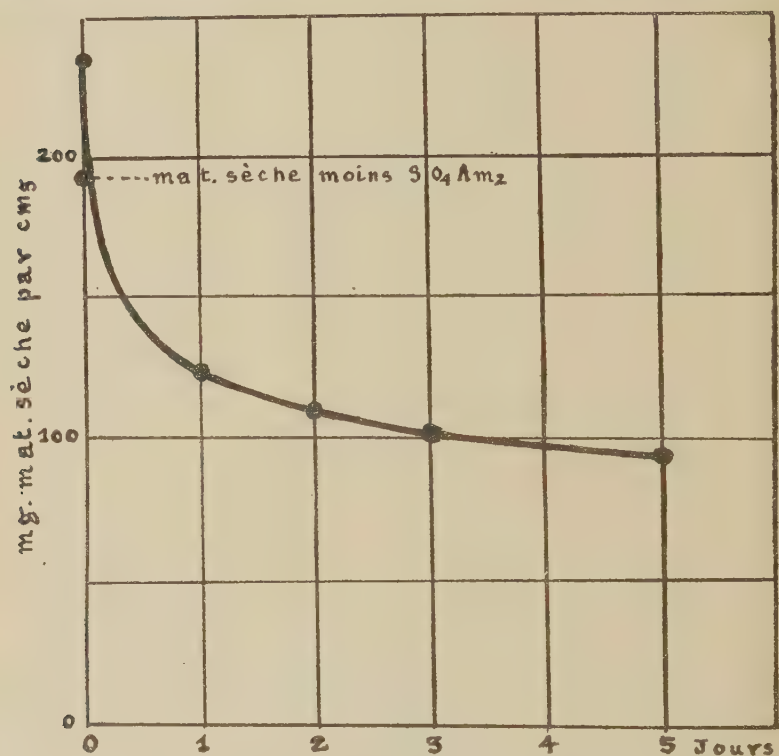


FIG. 2. — Elimination des impuretés inactives au cours de la dialyse en fonction du temps.

entièrement le dialyseur avec la solution, on ne le remplit qu'aux deux tiers ; on applique à son intérieur une légère pression d'air (30 cm. de mercure), on ferme l'appareil, puis on le place en eau courante. Tandis que l'eau pénètre par endosmose et comprime lentement et progressivement la couche d'air supérieure, le sulfate d'ammonium dialyse rapidement ; l'endosmose, rapide au début de la dialyse, se ralentit progressivement, d'une part grâce à l'augmentation de la pression hydrostatique intérieure et, d'autre

part, grâce à la diminution de la pression osmotique à la suite du départ du sulfate d'ammonium. De ce fait on n'atteint jamais la pression osmotique théorique de la solution initiale.

Nous avons fixé à trois jours la durée de la dialyse dans le dispositif que nous venons de décrire d'après l'allure de la courbe ci-dessus qui représente les variations de l'extrait sec de la solution dialysée en fonction du temps.

On voit que l'élimination du sulfate d'ammonium et de certaines impuretés qui accompagnent la toxine est très rapide au cours des vingt-quatre premières heures, ensuite, elle se ralentit considérablement pour devenir très faible après le troisième jour. A ce moment, la totalité du sulfate d'ammonium et 45 p. 100 des autres substances qui souillent la toxine dans cette préparation sont éliminées sans perte sensible de toxine.

LA TECHNIQUE. — En résumé, voici le protocole de la technique pratique : on place 35 l. 100 de toxine dans un grand récipient. On en prélève 50 c. c. auxquels on ajoute V gouttes d'une solution de bleu de bromo-thymol à 1 p. 100 (10). On détermine la quantité d'acide acétique à 1/20 qu'il est nécessaire d'ajouter à cette prise d'essai pour obtenir le virage de l'indicateur au jaune verdâtre : soit n c. c. On verse dans les 35 l. de toxine $n \times 35$ c. c. d'acide acétique pur, puis on ajoute comme antiseptique 20 c. c. de toluène. On fait barboter dans la solution pendant une nuit un léger courant d'air filtré sur coton pour entraîner le gaz carbonique libéré. Le matin on prélève à nouveau 50 c. c. de toxine que l'on titre comme précédemment avec de l'acide acétique à 1/20 : soit n' c. c. On ajoute $n' \times 35$ c. c. d'acide acétique pur aux 35 l. de toxine que l'on place dans l'appareil à concentrer sous le vide. On verse à la surface de la solution 7 c. c. d'alcool undécyclique [ou à défaut 10 c. c. d'une solution étherée d'alcool laurique à 5 p. 100] (11). On fait un vide de 73 à 74 cm. de mercure, puis on élève lentement la température de la solution à 25° environ, de façon à accélérer le départ du gaz carbonique. Après vingt à trente minutes de marche, on est averti que le dégagement de gaz carbonique est pratiquement terminé, car il fait place à un début de distillation de l'eau. On élève alors la température de la solution à 35° et l'on poursuit la distillation de l'eau jusqu'à réduction du volume à 5 litres.

On recueille le concentrat dans une terrine de 10 l. environ. Si la solution est légèrement acide (coloration vert jaune du papier au bleu de bromo-thymol), on la neutralise par addition d'ammoniaque concentrée jusqu'à virage au vert olive du papier au bleu de bromo-thymol. Si, au contraire, elle est légèrement alcaline (teinte verte un peu bleue du papier réactif), il est inutile de la neutraliser avant l'addition de

(10) Si la toxine est neutre (coloration verte du bleu de bromo-thymol), on n'ajoutera pas d'acide acétique ; on concentrera la solution telle quelle.

(11) Lorsque l'on emploie l'alcool laurique, il est nécessaire de surveiller attentivement le début de la distillation, car la mousse n'est bien cassée qu'après un certain temps de fonctionnement.

sulfate d'ammonium qui est toujours un peu acide par lui-même. On ajoute 1 kg. de sulfate d'ammonium que l'on dissout par brassage mécanique (dix à quinze minutes). On neutralise à nouveau la solution par addition d'ammoniaque si la chose est nécessaire. On ajoute quelques centimètres cubes de toluène, puis on laisse déposer le précipité pendant une nuit. On siphonne la solution surnageante que l'on filtre sur un entonnoir de Buchner garni de papier Chardin, puis on essore le précipité sur le même filtre.

On ajoute au filtrat 1,250 kg. de sulfate d'ammonium que l'on introduit par fractions. On le dissout comme précédemment par brassage mécanique (trente à quarante-cinq minutes) en ayant soin de briser de temps en temps avec un agitateur les masses de sel enrobé de précipité collant au fond de la terrine. Au fur et à mesure de la dissolution du sulfate d'ammonium, on maintient la neutralité de la solution par addition d'ammoniaque. On laisse reposer quelques heures. On récolte, tout d'abord, avec une cuillère la partie du précipité qui surnage, puis on filtre la solution sur un Buchner ; enfin on recueille le précipité qui adhère aux parois et au fond de la terrine. On réunit ces divers précipités et on les dissout dans de l'eau que l'on incorpore par petites quantités. On ajuste le volume de la solution à 700 c. c., c'est-à-dire à un volume cinquante fois plus petit que le volume de la toxine initiale [35 l.] (12), puis on ajoute 1,4 c. c. de formol dont on laisse agir le pouvoir antiseptique pendant quelques heures à la glacière.

On garnit deux dialyseurs avec 350 c. c. chacun de la solution précédente (13). On applique une pression d'air de 30 cm. de mercure à l'intérieur des dialyseurs, on les ferme, puis on les place verticalement dans un récipient dans lequel on établit un courant d'eau, en ayant soin de les alourdir afin qu'ils soient entièrement immergés. De façon à favoriser la diffusion des substances qui dialysent lentement, on agite le contenu des dialyseurs au moins deux fois par jour en les retournant deux ou trois fois. Après vingt-quatre heures de dialyse, on brosse soigneusement les dialyseurs, puis on les plonge pendant trente minutes dans une eau formolée à 2 p. 1.000 afin d'éviter le développement de microorganismes dans les pores et à la surface de l'étui de toile. On répète le brossage et le bain formolé après quarante-huit heures de marche. Après trois jours de dialyse, on

(12) Le précipité obtenu aux deux tiers de saturation en sulfate d'ammonium est d'importance très variable suivant les lots de toxine. Dans la plupart des cas, la solution obtenue en amenant le volume total à 700 c. c. présente une fluidité convenable. Cependant, il existe des cas où le précipité occupe déjà par lui-même un volume voisin de 700 c. c. ; on est alors obligé d'amener le volume de la solution à 1.000 c. c. Dans des cas inverses, la masse du précipité étant bien inférieure à la moyenne, il est inutile de le diluer à 700 c. c. ; on pourra se contenter d'un volume de 500 c. c. et même de 350 c. c. dans les cas extrêmes.

(13) Si l'on a été obligé de dissoudre le précipité contenant la toxine dans un volume supérieur à 700 c. c., il faudra utiliser un troisième dialyseur, car chaque dialyseur ne doit être rempli, au maximum, qu'aux deux tiers.

recueille la solution contenue dans les dialyseurs (14). Suivant la richesse en sulfate d'ammonium de la solution introduite dans les dialyseurs, la dilution au cours de la dialyse est plus ou moins importante. En partant de 700 c. c. de solution, on recueille après dialyse de 875 à 1.060 c. c. : la toxine est alors concentrée dans un volume trente-deux à quarante fois plus petit que le volume initial. Comme la solution dialysée est souvent troublée par la présence d'un fin précipité, on la filtre ou on la centrifuge. Elle se présente alors sous la forme d'un liquide très fortement coloré en brun rouge, de réaction légèrement acide (pH voisin de 6,7) et dont nous décrivons plus loin la composition.

LES RÉSULTATS. — Dans les tableaux suivants nous avons réuni les résultats que nous avons obtenus en appliquant la technique précédente à la concentration et à la purification de 14 lots de 35 litres chacun de toxine.

Tableau I. En partant de préparations de toxine titrant de 13

TABLEAU I.

NUMÉRO de la toxine (1)	TOXINE INITIALE par centimètre cube				CONC. NTRATION par rapport à la toxine initiale	TOXINE CONCENTRÉE et purifiée par centimètre cube			
	Unités toxiques	Milligrammes de matière sèche	Milligrammes N	N formol titrable		Unités toxiques	Milligrammes de matière sèche	Milligrammes N	N formol titrable (2)
1	15	36	3,9	1,1	30	340	97	14	
2	13,5	27			35	390	68	17	
3	21,5	37	4,2	1,4	35	530	68	10	
4	23,5	37	4,2	1,4	40	770	117	16	0,8
5	18,5	36	4,0	1,2	33	510	121	19	1
6	19	37	3,7	1,2	35	560	123	19	1
7	19	39	3,8	1,3	38	430	104	15	0,8
8	19	38	3,8	1,3	35	540	119	18	0,7
9	16,5	46	5,1	1,7	32	430	122	21	0,9
10	21	34	3,3	1,0	40	660	97	17	0,6
11	19	43	4,6	1,7	38	440	87	14	0,7
12	23,5	49	5,9	1,7	22	320	121	20	1
13	15,8	30	2,9	0,9	50	675	92	14	0,6
14	17,5	29	2,6	0,8	70	980	112	21	0,7
Moyenne . . .	18,5	37,5	4,0	1,3	41	540	104	17	0,8

(1) Toxines développées dans un milieu à base de panse de porc et additionné, soit d'extrait de viande : n° 1 à n° 12, soit de macération de veau : n° 13 et n° 14.

(2) Chiffres approximatifs.

(14) On peut utiliser sans inconvénient un même dialyseur au moins trois fois. On prendra soin seulement de bien le nettoyer, de le stériliser et de le conserver dans de l'eau formolée avant de le réemployer.

à 23 unités par centimètre cube, on obtient des solutions vingt-deux à soixante-dix fois plus concentrées contenant par centimètre cube de 310 à 980 unités (15).

Du fait de l'inconstance de la composition de la matière première (matière sèche : 29 à 49 mg. ; azote total : 2,6 à 5,9 mg. ; azote formol-titrable : 0,8 à 1,7 par centimètre cube), les solutions finales présentent elles-mêmes des constitutions assez variables (matière sèche : 68 à 127 mg. ; azote total : 10 à 21 mg. ; azote formol-titrable : 0,6 à 1 mg. par centimètre cube). En moyenne, en traitant une toxine titrant 18,5 unités et contenant 37,5 p. 1.000 de matière sèche et 4 p. 1.000 d'azote, on obtient une solution dont le volume est quarante fois plus petit que le volume de la solution initiale, possédant une activité très élevée : 540 unités par centimètre cube et contenant seulement 104 p. 1.000 de matière sèche et 17 p. 1.000 d'azote.

Tableau II. Le rendement oscille entre 60 et 100 p. 100 (moyenne : 78 p. 100).

TARLEAU II. — Activité des préparations obtenues au cours des étapes successives de la purification et rendement final.

Les titres des diverses préparations sont exprimés en unités par centimètre cube pour des solutions amenées au volume de la toxine initiale dont elles proviennent.

NUMÉRO de la toxine	TOXINE initiale	TOXINE concentrée	TOXINE PURIFIÉE		RENDEMENT final p. 100
			avant dialyse	après dialyse	
1	15	14,5	11	10	67
2	13,5		11	11	82
3	21,5	18,5	17,5	17,5	82
4	23,5	18,5	18	17	71
5	18,5	18,5	15,5	15,5	84
6	19	18,5	16,5	16,5	84
7	19	18,5	16	14	73
8	19	18,5	18,5	18,5	97
9	16,5	16,5	13,5	13,5	81
10	21	18,5	16,5	16,5	78
11	19	16,5	11,5	11,5	60
12	23,5	21	14,5	14,5	61
13	13,5	13,5	13,5	13,5	100
14	17,5	17,5	16	14	74
Moyenne . .					78

(15) Ces solutions ne contenant pas d'électrolyte, il est indispensable de les diluer dans une solution saline pour les titrer par floculation. Comme elles ont perdu également une partie des impuretés qui les accompagnaient dans la préparation initiale, il est bon d'utiliser comme diluant une solution de peptones afin d'obtenir des temps de floculation normaux.

Lorsqu'on suit l'évolution de l'activité des préparations obtenues au cours des étapes successives de la purification, on constate les faits suivants :

Les pertes de toxine au cours de la dialyse sont nulles ou très faibles ;

La baisse de l'activité à la suite de la concentration est variable, mais généralement elle est faible (16) ;

C'est surtout lors de la précipitation de la toxine par le sulfate d'ammonium que les pertes de toxine sont le plus sensibles.

Tableau III. Le degré de purification. Nous avons exprimé le degré de pureté de la toxine contenue dans les diverses prépara-

TABLEAU III.

NUMÉRO de la toxine	MILLIGRAMMES de matière sèche par unité			INDICE de purification rapporté à l'extrait sec (2)	MILLIGRAMMES N par unité		INDICE de purification rapporté à l'azote (3)
	Toxine initiale	Toxine purifiée			Toxine initiale	Toxine dialysée	
		avant dialyse (1)	après dialyse				
1	2,4	0,48	0,31	7,8	0,26	0,046	5,6
2	2,6	0,49	0,26	9,9		0,043	
3	1,7	0,17	0,13	13	0,19	0,019	10
4	1,6	0,29	0,15	8	0,17	0,020	8,5
5	2,0	0,36	0,23	8,5	0,21	0,037	5,7
6	1,9	0,34	0,22	8,7	0,19	0,033	5,7
7	2,0	0,29	0,24	8,4	0,19	0,035	5,4
8	2,0	0,28	0,22	9	0,20	0,032	6,2
9	2,8	0,39	0,28	10	0,30	0,047	6,3
10	1,6	0,23	0,14	11	0,15	0,025	6
11	2,2	0,39	0,20	11	0,24	0,033	7,3
12	2,0	0,92	0,40	5,2	0,25	0,062	4,2
13	2,2	0,19	0,14	16	0,21	0,021	10
14	1,7	0,14	0,11	15	0,15	0,021	7,5
Moyenne .	2,05	0,35	0,21	10	0,20	0,033	6,8

Toxine moyenne à 40 unités par centimètre cube : milligramme de matière sèche par unité, 0,95 ; milligramme d'azote par unité, 0,1.

(1) Matière sèche moins le sulfate d'ammonium..

(2) Milligrammes de matière sèche par unité dans la toxine initiale.

(3) Milligrammes de matière sèche par unité dans la toxine dialysée

Milligrammes d'azote par unité dans la toxine initiale

Milligrammes d'azote par unité dans la toxine dialysée

tions par la quantité de matière sèche qu'elles renferment par unité de toxine. De plus, comme la toxine est une protéine et qu'elle est souillée dans nos préparations, en grande partie par des

(16) Les résultats sont d'autant meilleurs que les conditions de température ont été mieux respectées et que la neutralité de la solution s'est mieux maintenue au cours de la concentration.

peptones provenant du milieu de culture, nous avons également déterminé le nombre de milligrammes d'azote contenu par unité de toxine dans la solution initiale et dans la solution finale. Ces chiffres sont donc d'autant plus faibles que la pureté de la toxine est relativement plus élevée. Enfin, nous avons exprimé sous le terme « indice de purification », le rapport entre les teneurs en matière sèche d'une part, et en azote d'autre part, de la solution initiale et de la préparation finale.

En résumé, on voit que la méthode permet de purifier la toxine contenue dans la préparation initiale, en moyenne, dix fois lorsqu'on se rapporte au poids de matière sèche et 6,8 fois lorsqu'on compare les teneurs en azote. Ces chiffres expriment des moyennes entre des écarts assez considérables suivant les lots de toxine. En effet, comme nous l'avions déjà remarqué à l'examen du premier tableau, on voit que la matière première renferme des quantités très variables d'impuretés et il s'ensuit des différences notables dans les degrés de purification des solutions finales de toxines concentrées.

En suivant les étapes successives de la purification, on constate que c'est la précipitation de la toxine par le sulfate d'ammonium qui élimine la majeure partie des impuretés : la dialyse n'en enlève qu'une proportion beaucoup plus faible.

Si l'on compare les solutions concentrées obtenues par cette méthode avec les préparations de toxine habituellement utilisées et titrant 40 unités par centimètre cube (0,95 mg. de matière sèche et 0,1 mg. d'azote par unité), on constate que, en moyenne, les solutions concentrées contiennent 4,5 fois moins de matière sèche par unité que les préparations habituellement utilisées et trois fois moins d'azote. Même dans les cas les plus défavorables (0,40 mg. de matière sèche et 0,62 mg. d'azote par unité) ces solutions concentrées renferment une quantité d'impuretés nettement inférieure à celle des toxines employées dans la pratique.

EN CONCLUSION, nous voyons que la méthode que nous venons de décrire permet d'obtenir, à partir de préparations de titre trop faible, des solutions de toxine de titre élevé et renfermant une quantité d'impuretés nettement plus faible que les toxines habituellement utilisées et ceci avec un rendement convenable et à l'aide d'opérations facilement réalisables dans la pratique.

Nous tenons à remercier M. Nitti qui nous a donné de précieux conseils et M. Rist qui a effectué les nombreux titrages d'activités de toxines qui furent nécessaires.

ACTION DES AGENTS CANCÉRIGÈNES CHIMIQUES SUR LES LEVURES

ACTION DE L'ARSENIC (*)

par P. BERAUD.

II. — CARACTÈRES SPÉCIAUX DES LEVURES ACCOUTUMÉES A L'ARSÉNITE DE SODIUM.

L'arsénite de sodium introduit dans une culture de levure donne lieu aux mêmes phénomènes de variabilité et de sélection que l'arséniate de sodium. Les colonies formées sont de tailles diverses et les vitesses de croissance des lignées qui apparaissent sont différentes.

D'une façon générale, ce qui a été dit précédemment, au sujet des levures accoutumées à l'arséniate, s'applique aux levures accoutumées à l'arsénite. En particulier, la levure Springer ne se multiplie que lentement au premier passage dans un milieu contenant $\frac{M}{200}$ d'arsénite. Par contre, une fois accoutumée et transportée dans un milieu sans arsénite, sa vitesse de multiplication est accélérée, et ceci pendant de nombreux passages. Il existe cependant quelques différences importantes entre les modes d'action des deux sels.

FERMENTATION ET RESPIRATION DES LEVURES ACCOUTUMÉES A L'ARSÉNITE. — L'action inhibitrice exercée par l'acide arsénieux sur la respiration cellulaire est connue depuis longtemps [24]. En ce qui concerne plus particulièrement les levures, cette action a été mise en évidence par Szent-Györgyi [25]. D'après les chiffres donnés par cet auteur, pour une concentration en arsénite de 0,03 M, l'absorption d'oxygène se trouve inhibée dans la proportion de 49 p. 100 alors que la vitesse de dégagement du gaz carbonique, dû à la fermentation, reste inchangée. Van Rensselaer Potter et C. A. Elvehjem [26] trouvent également une forte inhibition de la respiration et font voir que cet effet est indépendant du pH. Les chiffres suivants montrent l'action de l'arsénite de soude sur les échanges gazeux de la levure Springer.

(*) Voir ces *Annales*, 1943, 69, 230 et 275.

Echanges gazeux de la levure Springer (culture de quarante-huit heures) mise en suspension dans une solution à 5 p. 1.000 de monophosphate de potassium additionnée de 1 p. 100 de glucose :

$$Q_{O_2} = 16$$

$$Q_{CO_2}^{N_2} = 168$$

Echanges gazeux pour la même suspension additionnée de $\frac{M}{200}$ d'arsénite :

$$Q_{O_2} = 3$$

$$Q_{CO_2}^{N_2} = 145$$

On voit que si la respiration est fortement inhibée, la fermentation subit de son côté une chute qui n'est pas négligeable.

De même, si l'on compare les échanges gazeux de la levure Springer cultivée en présence d'arsénite $\frac{M}{200}$, à ceux de la levure témoin, on observe une forte baisse de la respiration et de la fermentation, contrairement à ce qui a été constaté à propos des arsénites (tableau VI). Avec les progrès de l'accoutumance, cette baisse s'atténue pour la respiration, mais elle persiste pour la fermentation.

TABLEAU VI. — Fermentation et respiration de la levure Springer se développant en présence d'arsénite $\frac{M}{200}$.

	Q_{O_2}	$Q_{CO_2}^{N_2}$
Levure Springer au 1 ^{er} passage en milieu à l'arsénite $\frac{M}{200}$.	5	128
Levure Springer au 6 ^e passage en milieu à l'arsénite $\frac{M}{200}$.	11	65
Levure accoutumée, au 3 ^e passage sans arsénite	15	132
Levure Springer témoin	16	164

COMPOSITION CHIMIQUE DES LEVURES ACCOUTUMÉES A L'ARSÉNITE. — Ici encore on trouve d'importantes variations de la teneur des globules en glucides. Mais ces variations sont inverses de celles provoquées par l'action des arsénites. La levure Springer, accoutumée à l'arsénite puis repiquée dans un milieu sans arsénite, contient davantage de glycogène que la levure témoin.

CONCURRENCE VITALE ENTRE LA LEVURE SPRINGER ACCOUTUMÉE A L'ARSÉNITE ET LA LEVURE TÉMOIN. — Les expériences ont été conduites de la même façon que pour la levure accoutumée à l'arsénite et répétées plusieurs fois à partir de culture en milieu liquide et de cultures sur milieux gélosés. Sauf en ce qui concerne

ces dernières, le poids moyen sec de la levure provenant du mélange est intermédiaire entre celui de la levure témoin et celui de la levure accoutumée. Sur gélose, l'élimination de la levure accoutumée paraît totale dès le premier passage. Pour les cultures en milieu liquide, les résultats semblent prouver que la levure à l'arsénite peut coexister avec la levure témoin pendant plusieurs centaines de générations.

RADIOSENSIBILITÉ A L'ULTRA-VIOLET DES LEVURES TRAITÉES. — Il était intéressant d'examiner la radiosensibilité d'une levure ayant subi l'empreinte d'un agent cancérigène chimique. Un tel examen offrait, en outre, la possibilité de vérifier une intéressante hypothèse de J. Beauverie [27] d'après laquelle la radiosensibilité des cellules de levure serait fonction de leur teneur en glycogène.

L'examen de la radiosensibilité a porté sur 7 échantillons provenant de levures traitées de différentes façons par l'arséniate ou l'arsénite. Les levures ont été cultivées en flacons de 500 c. c. contenant chacun 400 c. c. d'eau de tourillons saccharosée à 20 p. 100. Après quatre jours de culture à 27°, la levure était récoltée et les glucides étaient dosés dans les récoltes par la méthode précédemment décrite. Une faible partie de chaque récolte était étalée, après dilution convenable, à la surface d'eau de tourillons gélosée contenue dans des boîtes de Petri. Les boîtes étaient ensuite exposées, dans les mêmes conditions, à l'action des rayons ultra-violets pendant trente secondes. Après quarante heures, chaque boîte était examinée au microscope et l'on déterminait le pour-

TABLEAU VII. — Radiosensibilité et teneur en glucides.

	GLUCIDES totaux p. 100 du poids sec	GOMMES p. 100 du poids sec	GLYCOGÈNE p. 100 du poids sec	R p. 100
Levure Springer à son 1 ^{er} passage en milieu à $\frac{M}{200}$ d'arséniate . .	10,7	5,3	5,4	71
Levure Springer à son 35 ^e passage en milieu à $\frac{M}{200}$ d'arséniate . .	14,2	9,9	4,3	69
Levure accoutumée à l'arséniate, 1 ^{er} passage sans arséniate . . .	11,3	5,2	6,1	85
Levure Springer à son 1 ^{er} passage en milieu à $\frac{M}{200}$ d'arsénite. . .	7,9	5,8	2,1	67
Levure Springer à son 23 ^e passage en milieu à $\frac{M}{200}$ d'arsénite. . .	8,7	6,4	2,3	62
Levure accoutumée à l'arsénite, 3 ^e passage sans arsénite	23,3	13,5	9,8	59
Levure Springer témoin	19,8	6,5	13,3	56

centage R des globules stériles (chaque groupe de plus de 3 cellules a été compté pour une colonie). Le nombre R fournit une mesure de la radiosensibilité. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau VII.

La radiosensibilité à l'ultra-violet paraît être indépendante de la teneur en glucides. Elle est augmentée par l'action de l'arséniate et de l'arsénite. Cependant ces résultats ne peuvent être interprétés qu'avec circonspection. Même lorsqu'il s'agit de cultures du même âge [28] la radiosensibilité des levures à l'ultra-violet dépend encore, selon toute vraisemblance, de facteurs multiples agissant simultanément et il serait malaisé de déterminer d'une façon précise l'influence de chacun d'eux.

DISCUSSION.

Comme on l'a vu précédemment, les caractères acquis au cours de l'accoutumance ne se conservent pas lorsque la levure est repiquée dans un milieu sans arsenic. Ils disparaissent alors, les uns immédiatement, les autres avec plus ou moins de retard. Il n'en reste pas moins que si la levure est conservée en milieu à l'arsenic la transformation qu'elle a subie paraît être définitive.

Le processus qui conduit à la transformation de la levure cultivée en présence d'arsenic fait intervenir la sélection par mort, l'adaptation et la sélection par concurrence vitale. Tout semble indiquer que l'accoutumance s'effectue par paliers ; une lignée plus adaptée naissant à partir d'une cellule d'une lignée moins adaptée et ainsi de suite. Il est probable que la perte du caractère « adapté » s'effectue par un processus analogue se déroulant en sens inverse, mais cette hypothèse est difficilement vérifiable.

Il faut noter la très grande différence de sensibilité des cellules vis-à-vis de l'arsenic. Alors que certaines cellules sont tuées en quelques minutes, d'autres donnent naissance, d'emblée, à des lignées capables de vivre en concurrence vitale avec la levure témoin pendant de nombreuses générations.

On peut caractériser les cellules d'un tissu cancéreux, d'une part par leur multiplication exaltée, d'autre part par le déséquilibre qui existe entre leur respiration et leur glycolyse. En traitant les levures par l'arsenic, peut-on leur faire acquérir des caractères analogues à ceux des cellules cancéreuses ?

En ce qui concerne la multiplication, la réponse semble être affirmative. Dès que l'antiseptique disparaît du milieu où se développent les cellules, leur multiplication s'accélère et, ceci, pendant de nombreuses générations. Nous pouvons rapprocher cette circonstance de l'observation de Semon [29] d'après laquelle le cancer ne fait son apparition qu'un certain temps après que l'arsenic a exercé son action. Rien ne prouve cependant que l'accélération observée soit à comparer à celle qui caractérise les cellules cancé-

reuses, l'exaltation du développement, à la suite de l'action de l'antiseptique, n'étant pas produite uniquement par l'arsenic. On peut l'observer aussi dans le cas de l'acide fluorhydrique [30].

Le deuxième caractère par lequel se singularisent les cellules cancéreuses est le déséquilibre entre leur respiration et leur glycolyse. Meyerhof [31], étudiant les phénomènes qui accompagnent la contraction musculaire, a établi les faits suivants. Au point de vue biochimique le travail du muscle correspond à une première phase anaérobie pendant laquelle le glycogène, source de l'énergie musculaire, est transformé en acide lactique. Au cours d'une seconde phase aérobie, une certaine quantité de glycogène subit la combustion complète avec production de gaz carbonique et l'énergie dégagée par cette réaction est utilisée pour la resynthèse en glycogène de l'acide lactique formé pendant la contraction du muscle. Si la respiration cellulaire est insuffisante, l'acide lactique s'accumule. Ce cas est précisément celui de la cellule cancéreuse qui possède, ainsi que l'a fait voir Warburg, une respiration diminuée à côté d'une activité glycolytique intense. D'après Warburg, ce déséquilibre serait un caractère constant des cellules cancéreuses. Nous pourrions donc nous attendre à trouver, chez la levure traitée par un agent cancérigène, une forte fermentation anaérobie à côté d'une respiration affaiblie. Or rien de pareil n'a pu être observé, qu'il s'agisse d'arsénite ou d'arséniate.

A vrai dire, les conceptions de Warburg ont soulevé de nombreuses critiques. Plusieurs chercheurs ont signalé des cas de cancers ne présentant pas de déséquilibre entre respiration et glycolyse [32, 33]. Ce déséquilibre d'ailleurs ne paraît pas être l'apanage exclusif des cellules cancéreuses. Les leucocytes d'oie [34] et certains tissus comme la rétine offrent l'image d'un métabolisme analogue. Ces faits ont amené quelques auteurs à se demander si les considérations qui ont servi de point de départ aux travaux de Warburg étaient justifiées. Warburg a pensé que si l'on se proposait de trouver une explication à la croissance des tumeurs cancéreuses, il y avait lieu d'envisager les réactions productives d'énergie : c'est-à-dire la respiration et la glycolyse. Effectivement, lui et ses élèves, ont pu mettre en évidence dans des tumeurs le déséquilibre dont il est question plus haut. Rien ne prouve cependant, d'une façon certaine, qu'il y ait un rapport entre l'énergie libérée par la glycolyse et l'exaltation du développement cellulaire. Le problème des rapports entre glycolyse et multiplication est loin d'être éclairci. En fait, les très nombreux travaux auxquels a donné lieu, depuis vingt ans, la considération de ces rapports, n'ont abouti qu'à des conclusions incertaines et les essais de thérapeutique du cancer basés sur le rétablissement de l'équilibre dans les processus énergétiques sont restés sans résultat.

Dans le domaine des levures, nous avons essayé, à plusieurs

reprises, en produisant des modifications de la respiration et de la fermentation, d'agir sur la multiplication cellulaire, tantôt en utilisant l'action du radium [3], tantôt en changeant l'alimentation azotée des cellules [35]. Nos mesures étaient effectuées à l'aide des techniques manométriques de Warburg. En aucun cas, nous n'avons pu établir de parallélisme entre les échanges gazeux des levures et le rythme de leur multiplication. Mais les résultats du présent travail sont dans ce sens encore plus concluants : lorsque la levure Springer est cultivée en présence d'arséniate, son pouvoir fermentatif et son pouvoir respiratoire sont augmentés. Ils sont diminués dans les cultures effectuées en présence d'arsénite, et pourtant dans les deux cas le développement de la levure est inhibé dans une proportion notable. Inversement, la levure accoutumée à l'arsénite puis repiquée en milieu normal présente, à côté d'une multiplication exaltée, une respiration inchangée et une fermentation abaissée.

En ce qui concerne le problème de la multiplication, le comportement des levures accoutumées à l'arsenic puis repiquées en milieu sans arsenic fournit, par ailleurs, une indication intéressante. L'accélération de la vitesse de développement, que l'on peut observer dans ce cas, est toujours accompagnée d'une diminution du poids moyen sec des cellules. L'accélération semble être en rapport avec le fait que la formation d'une cellule se produit avec une moindre dépense d'énergie, soit que la cellule n'accumule plus de matières de réserve, soit que ses dimensions deviennent plus petites. Ce phénomène est-il la cause ou la conséquence de l'accélération du développement ? Il serait malaisé de répondre à cette question. Cependant le fait que l'exaltation du développement et la diminution des pouvoirs fermentatif et respiratoire sont parfois concomitants inciterait à pencher vers la seconde de ces hypothèses. Peut-être faut-il voir dans la variation des besoins de la cellule quant à l'énergie affectée à la reproduction, la cause des contradictions auxquelles ont abouti les auteurs qui ont étudié la multiplication cellulaire du point de vue énergétique.

Au sujet des variations du glycogène, il est intéressant de rappeler que les arsénates favorisent l'action de l'hexose-phosphatase [36]. Si l'on admet que la dégradation du glycogène s'effectue par l'intermédiaire des hexose-phosphates, on trouvera, là, une explication possible de la disparition partielle du glycogène dans les levures traitées à l'arséniate. Cependant cette disparition est loin d'être régulière. De plus, on la constate surtout chez les levures accoutumées à l'arséniate puis repiquées en milieu normal. Dans ce dernier cas, l'explication proposée semble ne pas pouvoir être admise. Il faut songer cependant que la levure cultivée en présence d'arséniate emmagasine de petites quantités de cette substance [37]. Il est possible que le métabolisme glucidique des

cellules accoutumées puis repiquées en milieu normal, soit influencé pendant quelques générations par une réserve de plus en plus réduite d'arséniate.

RÉSUMÉ.

Des cellules de levure Springer introduites dans un milieu de culture contenant de l'arséniate ou de l'arsénite de sodium, à une dose inférieure à la dose mortelle, donnent naissance à des lignées entre lesquelles s'opère une sélection, du fait de la concurrence vitale. Les diverses lignées possèdent des vitesses de développement différentes.

Les levures accoutumées à l'arsenic se distinguent des levures normales par la forme, la taille et le poids de leurs cellules. Si l'on repique les levures accoutumées, en milieu normal, les différences disparaissent après un certain nombre de passages.

De la levure Springer, accoutumée à une dose $\frac{M}{200}$ d'arséniate ou d'arsénite, puis repiquée en milieu sans arsenic, se multiplie davantage et plus rapidement que la levure Springer normale. Simultanément le poids moyen sec de ses globules est inférieur à celui de la levure témoin.

L'analyse chimique révèle d'importantes variations de la teneur en glycogène des levures traitées à l'arsenic. En général les levures accoutumées à l'arséniate puis repiquées en milieu sans arséniate contiennent moins de glycogène que la levure témoin. Le phénomène inverse se produit pour les levures accoutumées à l'arsénite puis repiquées en milieu sans arsénite.

La radiosensibilité à l'ultra-violet de la levure Springer traitée à l'arsenic est plus grande que celle de la levure non traitée. La radiosensibilité semble être indépendante de la teneur en glucides des cellules.

Dans des cultures effectuées en milieu liquide sans arsenic, les levures accoutumées à l'arséniate ou à l'arsénite, mises en concurrence vitale avec les levures normales, peuvent parfois coexister avec celles-ci pendant un certain nombre de générations.

Au premier passage, en eau de touraillons contenant $\frac{M}{200}$ d'arséniate, le pouvoir respiratoire et le pouvoir fermentatif de la levure Springer sont augmentés. Ils sont diminués dans les cultures effectuées en présence d'arsénite. Cependant dans les deux cas la multiplication est fortement entravée. Inversement, la levure accoutumée à l'arsénite puis repiquée en milieu normal présente à côté d'un développement accéléré une respiration inchangée et une fermentation abaissée. Il n'y a donc aucun parallélisme entre les échanges gazeux des levures et le rythme de leur multiplication. Dans le cas des levures accoutumées à l'arsenic puis

repiquées en milieu sans arsenic, l'accélération du développement semble être en rapport avec le fait que la formation d'une cellule nécessite moins d'énergie, soit que la cellule n'accumule plus de matières de réserve, soit que ses dimensions deviennent plus petites.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] WARBURG (Otto). *Stoffwechsel der Tumoren*. Berlin, 1926.
- [2] POURBAIX (Y.). *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 451 ; *Ibid.*, 1939, **131**, 1306.
- [3] LACASSAGNE (A.), SCHOEN (M.) et BERAUD (P.). *Ann. des Ferment.*, 1939, **5**, 129.
- [4] LUNDSGAARD. *Biochem. Zeitschr.*, 1930, **220**, 8 ; *Ibid.*, 1932, **250**, 61.
- [5] CAYROL et GENEVOIS. *C. R. Ac. Sci.*, 1931, **192**, 1494.
- [6] BRISOU (J.). Thèse, *Faculté des Sciences de Bordeaux*, 1933, Delmas, édit., Bordeaux.
- [7] NADSON (G. A.). *C. R. Ac. Sci.*, 1935, **209**, 1875 ; Changements des caractères héréditaires provoqués expérimentalement et la création de nouvelles races stables chez les levures. *Actualités scientifiques et industrielles*, 1937. Hermann et C^{ie}, édit., Paris.
- [8] FABIAN (F. W.) et Mc CULLOUGH (N. B.). *J. Bacter.*, 1934, **27**, 583.
- [9] HUTCHINSON (J.). *Trans. Path. Soc. Lond.*, 1888, **39**, 352.
- [10] KENNAWAY. *J. Industr. Hyg.*, 1925, **7**, 69.
- [11] KENNAWAY. *Brit. med. J.*, 1922, **ii**, 1107.
- [12] LEFÈVRE (J.). *Ann. Inst. Nat. Agron.*, 1939, **31**, 5.
- [13] EFFRONT (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1920, **83**, 806.
- [14] FINK (H.). *Zeitschr. Physiol. Chem.*, 1931, **195**, 215.
- [15] EFFRONT (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1920, **83**, 807.
- [16] RICHET (Ch.). *Ces Annales*, 1917, **31**, 51.
- [17] CARDOT (H.) et RICHET (Ch.). *Ces Annales*, 1919, **33**, 574.
- [18] BAKER (J. L.) et HULTON (H. F.). *Biochem J.*, 1920, **45**, 754.
- [19] BERAUD (P.). *Ann. des Ferment.*, 1941, **6**, 38.
- [20] DANYSZ. *Ces Annales*, 1900, **14**, 641.
- [21] SCHRYVER (S. B.), THOMAS (E. T.) et PAINE (S. G.). *J. Inst. Brew.*, 1927, **33**, 120.
- [22] LING (R.), NANJI (D. R.) et PATON (F. J.). *J. Inst. Brew.*, 1925, **31**, 316.
- [23] ONAKA. *Zeitschr. Physiol. Chem.*, 1911, **70**, 433.
- [24] SZENT-GYÖRGYI (A.). *Biochem J.*, 1930, **24**, 1722.
- [25] VAN RENNELAER POTTER et ELVEHJEM (C. A.). *Biochem. J.*, 1936, **30**, 189.
- [26] BEAUVERIE (J.). *C. R. Ac. Sci.*, 1934, **199**, 881.
- [27] NADSON (G.) et STERN (C.). *C. R. Acad. Sci. de l'U. R. S. S.*, 1931, **39**, d'après *Ann. Brass. et Dist.*, 1931, **29**, 337.
- [28] SEMON. *Brit. med. J.*, 1922, **ii**, 975.
- [29] EFFRONT (J.). *Monit. Scient. Quesneville*, 1891, 1137.
- [30] MEYERHOF (O.). *Ergebn. der Physiol.*, 1923, **22**, 328.

- [32] MURPHY et HAWKINS. *J. Gen. Phys.*, 1925, **8**, 115.
- [33] PENTIMALLI. *Zeitschr. Krebsforsch.*, 1927, **25**, 347, cité par CRAB-
TREE (H. G.). *Biochem. J.*, 1928, **22**, 1289.
- [34] FLEISCHMAN et KUBOWITZ. *Biochem. Zeitschr.*, 1927, **181**, 395.
- [35] BERAUD (P.). *Ann. des Ferment.*, 1940, **5**, 402.
- [36] HARDEN (A.) et YOUNG (W. J.). *Proc. Roy. Soc., B.*, 1911, **83**, 451.
- [37] CHARPENTIER. *Ces Annales*, 1915, **29**, 443.

SUR QUELQUES DÉRIVÉS DE L'ÉTHYLÈNEDIAMINE A ACTION TRYPANOCIDE

par ALBERT FUNKE, DANIEL BOVET et GEORGES MONTEZIN (*)

(Institut Pasteur.

Laboratoire de Chimie thérapeutique de M. E. FOURNEAU.)

Au cours de nos recherches sur les diamines provenant de la benzylamine (1), nous avons constaté qu'un certain nombre d'entre elles, et particulièrement celles dont le noyau benzénique est substitué, ont une action trypanocide très caractéristique qui s'exerce aussi par voie buccale.

Pour nous rendre compte de l'influence des radicaux substituants, nous avons préparé une série de corps qui tous ont été essayés sur la souris infectée par le *Tr. brucei*, agent du nagana des bovidés.

Cette action assez inattendue peut cependant être mise en parallèle avec celle d'un acide *p*-phénylarsinique portant la chaîne éthylènediamine fixée en para sur le noyau benzénique (2) dont l'activité par voie buccale était sensiblement la même que par voie sous-cutanée, le coefficient chimiothérapeutique conservant à peu près la même valeur, ce qui est exceptionnel dans la série des acides arsenicaux, tout au moins dans les trypanosomiasés.

Avant d'indiquer les résultats des essais sur les trypanosomiasés, nous donnerons quelques indications sur la préparation de ces différents corps :

(Benzylamino)-1 amino-2 éthane :
 $C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot NH_2$ (1945 F).

Ce corps a été préparé par Van Alphen (3) avec des rendements très faibles. En effet, au cours de la réaction qui consiste à réduire par le sodium et l'alcool le produit de condensation de l'éthylènediamine avec le benzaldéhyde, il se fait surtout de la N-N' dibenzyléthylènediamine.

Pour pouvoir obtenir une quantité suffisante de monobenzyl-

(*) Voir note préliminaire : *Bull. Soc. Path. exot.*, 1942, **35**, 210.

(1) A. FUNKE et J.-P. FOURNEAU, *Bull. Soc. Ch. Fr.*, 1942 (5), **9**, 805, 806.

(2) E. FOURNEAU et A. FUNKE, *Bull. Soc. Ch. Fr.*, 1928 (4), **43**, 889.

(3) VAN ALPHEN, *C. R.*, 1935 (4), **54**, 1595.

éthylènediamine nous avons trouvé préférable de faire réagir sur le chlorure de benzyle un excès d'éthylènediamine.

On mélange 1 mol. de chlorure de benzyle avec 4 mol. d'éthylènediamine monohydratée et on ajoute ensuite assez d'alcool pour obtenir une solution homogène. On chauffe douze heures environ en tube scellé à 120°. On chasse l'alcool et on reprend le résidu avec de la lessive de soude et un peu d'eau ; on décante soigneusement la couche huileuse et on la soumet à la distillation fractionnée. La partie passant entre 125-130° sous 10 mm. est recueillie et titrée. A partir de 12 g. de chlorure de benzyle on obtient 6 g. de benzyléthylènediamine :

Dosage : PM = 150. Subst., 0,9943 g. Calc. 13,25 c.c. Tr., 13,66 c.c.
ClH N (hélianthine).

Le dichlorhydrate peut être recristallisé dans une solution hydroalcoolique ; il fond vers 255°. Le résidu de distillation passe vers 190° sous 10 mm. et est formé de N-N' dibenzyléthylènediamine.

La plupart des dérivés substitués du corps ci-dessus que nous allons décrire maintenant ont été préparés d'une façon analogue. Nous avons souvent constaté qu'il est inutile de chauffer le dérivé chlorométhylé avec l'éthylènediamine en tube scellé, mais qu'il suffit de laisser ces deux produits en contact à la température ordinaire pour provoquer la réaction. Les différents dérivés chlorométhylés dont nous avons eu besoin ont été obtenus par la méthode si féconde de Blanc qui fixe le groupe $\text{—CH}_2\text{Cl}$ par action de ClH sec gazeux sur un mélange bien agité de carbure avec le trioxy-méthylène et le chlorure de zinc :

(p-méthylbenzylamino)-1 amino-2 éthane :
 $\text{CH}_3 \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{NH}_2$ (2156 F).

En partant du chlorure de p-méthylbenzyle et de l'éthylènediamine en excès, on obtient le corps cherché en ayant soin toutefois d'extraire la couche huileuse par le benzène.

Eb₁₃ mm. = 140°.
Dosage : PM = 164 Subst., 0,2683 g. Calc., 3,3 c.c. ClH N
Tr., 3,3 c.c. ClH, N.

Le dichlorhydrate correspondant fond vers 205° :

(p-éthylbenzylamino)-1 amino-2 éthane :
 $\text{C}_2\text{H}_5 \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{NH}_2$ [2440 RP] (*).

Préparé à partir du chlorure de p-éthylbenzyle et de l'éthylènediamine. Le dichlorhydrate, très soluble dans l'eau, fond avec décomposition entre 216-218° :

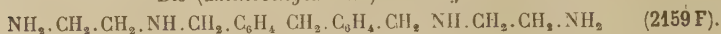
Dosage : Cl p. 100 Tr., 28,1 Calc., 28,3 N p. 100
Tr., 11,1 Calc., 11,15.

(p-n-propylbenzylamino)-1 amino-2 éthane :
 $(\text{C}_3\text{H}_7) \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{NH}_2$ (1986 F).

(*) Les produits marqués RP ont été préparés par MM. VIAUD et HORCLOIS aux Usines Rhône-Poulenc.

Le dichlorhydrate correspondant est soluble dans l'eau tiède. Il fond mal vers 230° :

Bis (aminoéthylamino) dibenzylméthane :



$\text{Eb}_{0,6 \text{ mm.}} = 250-260^\circ.$

Dosage : PM = 312 Subst., 0,3175 Calc., 4,07 ClH N
Tr., 4,45 ClH N.

(p-phényléthyl-benzylamino)-1 amino-2 éthane :



$\text{Eb}_{10 \text{ mm.}} = 228-235^\circ.$

Dosage : PM = 254 Subst. : 0,377 g. Calc., 2,96 ClH N
Tr., 3,00 ClH N.

Bis (amino-éthylamino) dibenzyléthane :



$\text{Eb}_{0,8 \text{ mm}} = 255-268^\circ.$

Dosage : PM = 326 Subst., 0,2271 Calc., 2,78 Tr., 2,85.

(p-cyclopentylbenzylamino)-1 amino-2 éthane :



$\text{Eb}_{14 \text{ mm.}} = 180-196^\circ.$

Dosage : PM = 218 Subst., 0,6859 g., Calc., 6,29 c. c.
Tr., 6,31 c. c. ClH N.

(p-cyclohexylbenzylamino)-1 amino-2 éthane :



$\text{Eb}_7 \text{ mm.} = 187-190^\circ.$

Dosage : PM = 332 Subst., 1,43395 g. Calc., 9,77 c. c. ClH N
Tr., 9,70 c. c. ClH N.

Chlorhydrate de (p-cyclohexyl-benzylamino)-1 guanidino-2 éthane :



On fait bouillir à reflux pendant cinq heures 4 g. de dichlorhydrate du (p-cyclohexyl-benzylamino)-1 amino-2 éthane avec un grand excès de cyanamide. Tout se dissout. Par refroidissement, une partie de la guanidine se sépare sous forme cristalline ; une autre partie peut être récupérée en traitant les eaux-mères par de l'éther :

Dosage : Cl p. 100 Calc., 20,4 p. 100 Tr., 20,56 p. 100.

(Diméthyl-2-5-benzylamino)-1 amino-2 éthane :



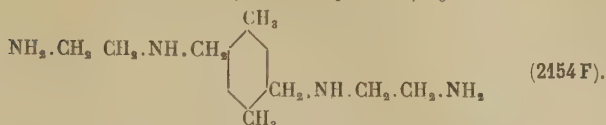
$\text{Eb}_{16 \text{ mm.}} = 155-160^\circ.$

Dosage : PM = 178 Subst., 0,4824 Calc., 5,42 ClH N
Tr., 5,30 ClH N.

Dichlorhydrate : F = 255° (décomp.).

Bis (diméthyl-2-5 benzylamino)-1-2 éthane :

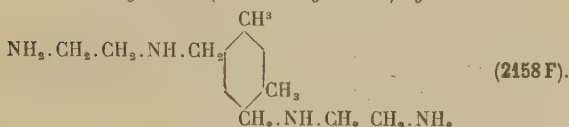


Diméthyl-2-5 di(amino-éthylamino)-xylène-1-4 :Eb_{0,7 mm.} = 190-192°.

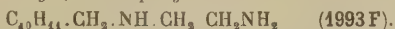
Dosage : PM = 250 Subst., 0,233 g. Tr., 3,76 c.c. ClH N
 Calc., 3,80 c.c. ClH N.

(Diméthyl-2-4 benzylamino)-1 amino-2-éthane :Eb_{13 mm.} = 150-154°.

Dosage : PM = 178 Subst., 0,2020 Calc., 2,2 ClH N
 Tr., 2,2 c.c. ClH N.

Diméthyl-2-4 di(amino-éthylamino)-xylène-1-5 :Eb_{1,52 mm.} = 200-205°.

Dosage : PM = 250 Subst., 0,256 Calc., 4,09 c.c. ClH N
 Tr., 3,95 c.c. ClH N.

b-tétrahydro-ménaphtylamino-1 amino-2 éthane :

Par condensation de la b-chlorométhyltétraline avec un excès d'éthylènediamine.

Eb_{0,3 mm.} = 170-175°.

Dosage : PM = 204 Subst., 1,0251 g. Calc., 10,5 c.c. ClH N
 Tr., 10,10 c.c. ClH N.

Une seconde fraction passe entre 240-250° sous 0,8 mm. et a pu être identifiée sous forme du dichlorhydrate comme étant le composé dimoléculaire symétrique correspondant (2001 F) :

Dosage : Cl p. 100 Calc., 16,86 p. 100 Tr., 16,63 p. 100.

Ménaphtylamino-1 amino-2 éthane :

Par condensation de l'α-chlorométhylnaphtalène avec un excès d'éthylènediamine.

Eb_{14 mm.} = 200°.

Dosage : PM = 200 Subst., 1,523 g. Calc., 15,23 c.c. ClH N
 Tr., 15,00 c.c. ClH N.

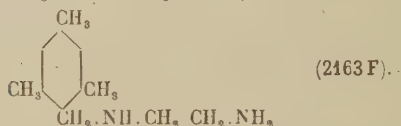
Isopropyl-ménaphtylamino-1 amino-2 éthane :

Par condensation de l' α -chlorométhyl-*p*-isopropylnaphtalène avec un excès d'éthylènediamine.

$Eb_6 \text{ mm.} = 187^\circ.$

Dosage : PM = 242 Subst., 0,702 g. Calc., 5,8 c.c. ClH N
Tr., 5,8 c.c. ClH N.

(Triméthyl-2-4-6 benzylamino)-1 amino-2 éthane :

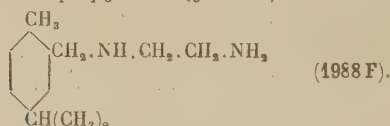


Se prépare à partir du chlorométhylmésitylène et de l'éthylènediamine.

$Eb_{12} \text{ mm.} = 160-164^\circ.$

Dosage : PM = 192 Subst., 0,595 g. Calc., 3,1 c.c. ClH N
Tr., 3 c.c. ClH N.

(Méthyl-2 isopropyl-5 benzylamino)-1 amino-2 éthane :

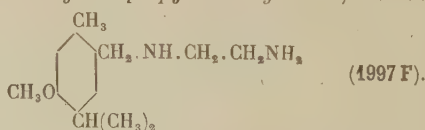


Se prépare comme le (*p*-isopropylbenzylamino-1 amino-2 éthane en partant du chlorure de méthyl *p*-isopropyl-*o*-méthylbenzène.

$Eb_{10} \text{ mm.} = 165^\circ.$

Dosage : PM = 206 Subst., 0,254 g. Calc., 2,46 c.c. ClH N
Tr., 2,50 c.c. ClH N.

(Méthyl-2 méthoxy-4 isopropyl-5 benzylamino)-1 amino-2 éthane :

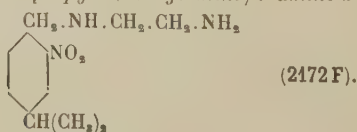


Par condensation du chlorure de méthyl-2 méthoxy-4 isopropyl-5 α -chlorotoluène avec l'éthylènediamine en excès.

$Eb_{12} \text{ mm.} = 190-195^\circ.$

Dosage : PM = 236 Subst., 0,380 g. Calc., 3,22 ClH N
Tr., 3,15 c.c. ClH N.

(Nitro-2 isopropyl-4 benzylamino)-1 amino-2 éthane :



La condensation du chlorure de nitrocuminyne avec un excès d'éthylènediamine se fait à la température ordinaire en milieu alcoolique. Comme dans presque toutes ces réactions, il se forme à côté du corps renfermant 1 mol. d'éthylènediamine, le produit doublé symétrique. La séparation de ces deux corps se fait aisément par la différence de solubilité dans l'eau et l'alcool des deux chlorhydrates correspondants ; on évite ainsi une distillation fractionnée des bases.

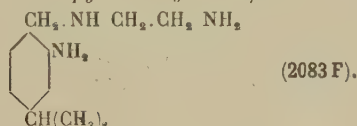
Le dichlorhydrate de 1' (*o*-nitro *p*-isopropyl benzylamino)-1 amino-2 éthane est soluble à froid dans l'eau et l'alcool. Son point de fusion est 170° environ (décomp.) :

Dosage : Cl p. 100 Calc., 22,86 Tr., 22,91.

Le dichlorhydrate de di(nitro-2-2' isopropyl-4-4' benzylamino)1-2 éthane (2173 F) est par contre insoluble à froid dans l'eau, mais peut être recristallisé dans l'eau bouillante. F = 210° (décomp.) :

Dosage : PM = 487 Cl p. 100 Calc., 14,57 Tr., 14,61.

(Amino-2 isopropyl-4 benzylamino)-1 amino-2 éthane :

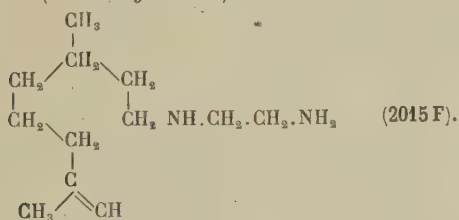


Se prépare très facilement par réduction du dérivé nitré en milieu hydro-alcoolique par le nickel de Raney à la température et à la pression ordinaires.

Le dichlorhydrate fond à 220° avec décomposition :

Dosage : PM = 280 Cl p. 100 Calc., 25,35 Tr., 25,22.

(Citronellyl amino)-1 amino-2 éthane :

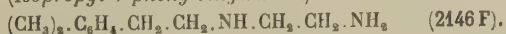


Par condensation du chlorure de citronellyle avec un excès d'éthylènediamine.

Eb₂₄ mm. = 156-160°.

Dosage : PM = 197 Subst., 1,313 Calc., 13,2 c.c. ClH
Tr., 13,1 c.c. ClH N.

(Isopropyl-4 phényléthylamino) 1 amino-2 éthane :



A partir du chlorure de *p*-isopropylphényléthyle (1 mol.) et de l'éthylènediamine (4 mol.).

Eb₁₈ mm. = 170°.

Dosage : PM = 206 Subst., 0,489 gr. Calc., 4,74 c.c. ClH N
Tr., 4,70 c.c. ClH.

Diéthylamino-1 (p-isopropylbenzylamino)-4 pentane :

$(\text{CH}_3)_2 \cdot \text{CH} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CH}_2 \text{ NH} \cdot \text{CH}(\text{CH}_2) \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ (1989 F).

On chauffe en tube scellé pendant douze heures à 130° une solution alcoolique d'un mélange de 1 mol. de chlorure de cuminyne et de 2 mol. de diéthylamino-1 amino-4 pentane. On traite par de la lessive de soude et on extrait à l'éther :

Eb₈ mm. = 170-172°.

Dosage : PM = 290 Subst., 1,2524 g. Calc., 8,63 c.c. ClH N
Tr., 8,65 c.c. ClH N.

Le dichlorhydrate, très hygroscopique, peut être purifié par recristallisation dans l'alcool :

p-isopropylbenzylpipérazine :

$(\text{CH}_3)_2 \text{ CH} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CH}_2 \text{ N} \begin{array}{c} \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \\ \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \end{array} \text{ NH}$ (1966 F).

Par condensation du chlorure de cuminyne avec de la pipérazine par la méthode habituelle.

Eb₁₃ mm. = 165°.

Dosage : PM = 218 Subst., 0,6237 g. Calc., 5,72 c.c. ClH N
Tr., 5,65 c.c. ClH N.

(p-isopropylbenzylamino)-1 amino-6 hexane :

$(\text{CH}_3)_2 \text{ CH} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CH}_2 \text{ NH} \cdot (\text{CH}_2)_6 \cdot \text{NH}_2$ (1994 F).

Par condensation du chlorure de cuminyne avec un excès d'hexaméthylènediamine.

Eb_{1,2} mm. = 190°.

Dosage : PM = 248 Subst., 0,771 g. Calc., 6,2 c.c. ClH N
Tr., 6,1 c.c. ClH N.

Une deuxième fraction passe entre 250-260° sous 2 mm. et constitue le composé dimoléculaire symétrique correspondant (1995 F) :

Dosage : PM = 380 Subst., 0,554 g. Calc., 2,9 c.c. ClH N
Tr., 2,9 c.c. ClH N.

Par condensation d'amines du type

$\text{R} - \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{NH}_2$ ou $\text{R} = \text{H}, (\text{CH}_3)_2 \cdot \text{CH} -$, ou C_6H_{11} ,

avec la β -dichlorhydrine de la glycérine, on obtient les corps symétriques de la formule suivante :

$\text{R} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CHOH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_4 - \text{R}.$

La méthode de préparation est la suivante :

On mélange 4 mol. d'amine avec 1 mol. de β -dichlorhydrine. On chauffe lentement le mélange vers 150° ; à ce moment la réaction se fait avec dégagement de chaleur. Le chlorhydrate de l'amine en excès précipite ; on traite à l'éther, on essore, sèche et chasse le solvant. On distille sous pression réduite :

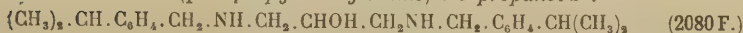
Dibenzylamino-1-3 propanol-2 :



$\text{Eb}_{\text{mm.}} = 217-220^{\circ}$.

Dosage : PM = 270 Subst., 0,4355 g. Calc., 3,28 ClH N
Tr., 3,35 ClH N.

Di(p-isopropyl-benzylamino)-1-3 propanol-2 :



Ce produit est obtenu assez pur et il n'est pas nécessaire de le distiller :

Dosage : PM = 354 Subst., 0,241 g. Calc., 1,36 c. c. ClH N
Tr., 1,30 c. c. ClH N.

Di(p-cyclohexylbenzylamino)-1-3 propanol-2 :



Dosage : PM = 434 Subst., 0,7674 g. Calc., 3,53 c. c. ClH N
Tr., 3,54 c. c. ClH N.

Enfin, dans les corps qui suivent nous avons remplacé le groupe alcoyle par NO^2 , NH^2 , CN et Cl :

Dichlorhydrate de (nitro-4 benzylamino)-1 amino-2 éthane :



et dichlorhydrate du di(nitro-4 benzylamino)-1-2 éthane :



Ces deux corps se forment simultanément et peuvent être isolés d'une façon tout à fait analogue à celle du (nitro-2 isopropyl-4 benzylamino)-1 amino-2 éthane (2172 F) [p. 10]. Le premier fond vers 218° et est très soluble dans l'eau froide :

Dosage : PM = 268 Cl p. 100 Calc., 26,45 Tr., 26,32.

Le deuxième fond vers 260° avec décomposition et n'est soluble dans l'eau qu'à ébullition :

Dosage : PM = 402 N p. 100 Calc., 13,89 Tr., 13,87.

Dichlorhydrate de (amino-4 benzylamino)-1 amino-2 éthane :



Par réduction catalytique du dérivé nitré correspondant en milieu hydro-alcoolique en présence de Ni-Raney. Très facilement soluble dans l'eau.

F = 200-235°.

Dosage : PM = 238 N p. 100 Calc., 17,64 Tr., 17,59.

(Cyano-4 benzylamino)-1 amino-2 éthane :

 $\text{CN.C}_6\text{H}_4.\text{CH}_2.\text{NH.CH}_2.\text{CH}_2.\text{NH}_2$ (2097 F).

Cette base distille entre 160 et 170° sous 1,6 mm. :

Dosage : PM = 175 Subst., 0,225 g. Calc., 2,56 c.c. ClH N
Tr., 2,60 c.c. ClH N.

Le dichlorhydrate correspondant fond mal vers 260° :

(Chloro-4 benzylamino)-1 amino-2 éthane :

 $\text{Cl.C}_6\text{H}_4.\text{CH}_2.\text{NH.CH}_2.\text{CH}_2.\text{NH}_2$ (2115 F).Eb₂ mm. = 135°.Dosage : PM = 184,5° Subst., 0,4915 g. Calc., 5,3 c.c. ClH N
Tr., 5,5 c.c. ClH N.

Le résidu de distillation est dissous à chaud dans un peu d'alcool. Par refroidissement on obtient des cristaux qui fondent à 120°. C'est le di(chloro-4 benzylamino)-1-2 éthane :

 $\text{Cl.C}_6\text{H}_4.\text{CH}_2.\text{NH.CH}_2.\text{CH}_2.\text{NH.C}_6\text{H}_4.\text{Cl}$ (2116 F).

Dosage : PM = 309 Cl p. 100 Calc., 22,93 Tr., 22,98.

*
* *

L'activité trypanocide de toutes les amines nouvellement préparées a été déterminée sur l'infection murine à *Trypanosoma brucei*. La technique employée a été la suivante : inoculation intrapéritonéale, examen quotidien du sang frais, administration du médicament par voie sous-cutanée ou par voie buccale dès que les trypanosomes apparaissent dans le sang périphérique (environ 10.000 par millimètre cube). La souche de *Trypanosoma* utilisée provoquait régulièrement la mort des animaux non traités en quatre ou cinq jours.

Trente-neuf des produits dont la synthèse a été décrite dans la première partie de ce travail ont été expérimentés sur la souris trypanosomée. Huit d'entre eux ont provoqué la guérison des animaux traités, 23 se sont montrés totalement inactifs.

a) Dérivés provoquant la guérison des souris traitées curativement, c'est-à-dire la disparition des parasites du sang pendant le mois qui suit le traitement chez les trois quarts au moins des souris traitées :

2440 RP (p-éthylbenzylamino)-1 amino-2 éthane ;

1986 F (p-n-propylbenzylamino)-1 amino-2 éthane ;

1921 F (p-isopropylbenzylamino)-1 amino-2 éthane ;

2463 RP (p-sec. butyl-benzylamino)-1 amino-2 éthane ;

1993 F b-tétrahydro-ménaphtylamino-1 amino-2 éthane ;

1999 F isopropyl-ménaphtylamino-1 amino-2 éthane ;

1988 F (méthyl-2 isopropyl-5 benzylamino)-1 amino-2 éthane ;

2115 F (chloro-4 benzylamino)-1 amino-2 éthane.

b) Produits dont l'injection est suivie d'une disparition temporaire des parasites ou d'une infection chronique, permettant la survie de l'animal pendant dix jours ou plus malgré la présence des parasites dans le sang :

- 1943 F di(*p*-isopropylbenzylamino)-1-2 éthane ;
- 2160 F (*p*-phénylméthyl-benzylamino)-1 amino-2 éthane ;
- 1971 F (*p*-cyclopentylbenzylamino)-1 amino-2 éthane ;
- 1955 F (*p*-cyclohexylbenzylamino)-1 amino-2 éthane ;
- 2157 F (diméthyl-2-4 benzylamino)-1 éthane ;
- 1990 F ménaphtylamino-1 amino-2 éthane ;
- 2015 F (citronellyl amino)-1 amino-2 éthane ;
- 2146 F (isopropyl-4 phényléthylamino)-1 amino-2 éthane.

c) Produits inactifs. Ce sont ceux dont les numéros suivent : 1945 F, 2156 F, 1964 F, 1947 F, 2462 RP, 2159 F, 2162 F, 2161 F, 1968 F, 2152 F, 2153 F, 2154 F, 2158 F, 2163 F, 2172 F, 2083 F, 1939 F, 1966 F, 1994 F, 2170 F, 2171 F, 2075, 2097 F.

Nous avons fait figurer dans le tableau suivant les résultats détaillés d'une expérience effectuée avec le (*p*-isopropylbenzylamino)-1 amino-2 éthane (1921 F) et le (*p*-*n*-propylbenzylamino)-1 amino-2 éthane (1986 F). La toxicité de ces produits a été régulièrement recherchée chez la souris, par voie sous-cutanée pour les produits solubles, et par voie buccale en suspension dans la gomme acacia, pour les produits insolubles.

Par voie sous-cutanée le 1921 F, ainsi que les dérivés voisins : 2156 F, 2440 RP, 1986 F, sont tous toxiques à la dose de 10 mg. pour 20 g., et tolérés à la dose de 5 mg. pour 20 g.

Ces protocoles mettent bien en évidence l'action de certains produits de cette série lorsqu'ils sont administrés par voie buccale. Chose curieuse, cette propriété n'est pas générale et si le (*p*-isopropylbenzylamino)-1 amino-2 éthane (1921 F) a sensiblement le même coefficient chimiothérapeutique lorsqu'il est administré par voie buccale et par voie sous-cutanée, le (*p*-éthylbenzylamino)-1 amino-2 éthane (2440 RP), qui se montre tout aussi actif par voie sous-cutanée, est dépourvu de propriétés thérapeutiques lorsqu'il est introduit par voie buccale.

L'injection du produit 1921 F est suivie de l'apparition dans le sang de formes de trypanosomes atypiques, globuleuses, vacuolisées, géantes ou en état de division. Après une dose convenable les parasites disparaissent du sang périphérique en seize heures environ. Ce dérivé s'est montré également actif dans l'infection du cobaye par le *Tr. brucei*.

En ce qui concerne les rapports entre l'activité trypanocide de ces dérivés et leur constitution, on peut faire les observations suivantes.

En premier lieu les composés nouveaux dont l'activité a été décrite dans cette note ne peuvent être rattachés à aucune des séries trypanocides connues.

	1921 F						1936 F			TÉMOINS	
	Voie sous-cutanée			Voie buccale			Voie buccale			In.	In.
	In.	In.	In.	In.	In.	In.	In.	In.	In.	In.	In.
	4/2 0,005	4/50 0,005	4/50 0,0025	4/10 0,005	2 0,005	4/40 0,005	4/40 0,005	2 0,005	2 0,005	4/10 0,005	2 0,005
Inoculation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Parasites le lendemain.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dose administrée (en g. pour 20 g.)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Parasites après traitement :											
1 jour	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			1/20 Mort	1/4 à + 40 j. après trait.							

Si l'on prend maintenant comme type le dérivé 1921 F : $p-i-C^3H^7.C^6H^5.CH^2.NH.CH^2.CH^2.NH^2$, qui est en somme le plus actif, les résultats dès à présent obtenus font apparaître que son activité est liée à la présence dans la molécule d'une chaîne diaminée ; la *p*-isopropylbenzylamine est, en effet, inactive. Dans les exemples étudiés, la substitution des deux hydrogènes de l'amine terminale s'est montrée défavorable ; le diéthylamino-4 (*p*-isopropylbenzylamino) pentane (1939 F) est inactif ; par contre, les dérivés symétriques disubstitués de l'éthylènediamine, comme le di(*p*-isopropylbenzylamino)-1-2 éthane (1943 F), ont montré une activité satisfaisante. Un dérivé de l'hexaméthylènediamine, le (*p*-isopropylbenzylamino)-1 amino-6 hexane (1994 F) n'est pas trypanocide.

La présence d'un deuxième substituant sur le noyau benzénique joue, comme la chaîne diaminée, un rôle qui paraît essentiel. C'est ainsi que tandis que le benzylamino-1 amino-2 éthane (1945 F) est notablement inactif, la substitution des radicaux suivants en position para aboutit à des dérivés actifs :



et, fait remarquable, Cl.

Par contre, d'autres radicaux, également introduits en position para, ne confèrent aucune activité particulière à la molécule de la benzyléthylènediamine : ce sont CH^3 , CN, NO^2 , C^6H^5 , $CH^2.CH^2.C^6H^5$.

Quelques essais ont été faits dans lesquels le noyau benzénique de la benzyléthylènediamine était tri- et tétra-substitué ; ils n'ont généralement pas été heureux. Il faut faire une exception pour le (diméthyl-2-4 benzylamino)-1 éthane (2157 F) qui témoigne d'une légère activité trypanoicide, alors que le dérivé (diméthyl-2-5 benzylamino)-1 amino-2 éthane (2152 F) est complètement inefficace. Le dérivé naphthalénique (mé-naphtylamino-1 amino-2 éthane (1990 F) est peu actif, mais le dérivé du tétrahydronaphtalène (1993 F) et le 1999 F, ou isopropyl-ménaphtylamino-1 amino-2 éthane sont plus efficaces.

Deux points méritent encore d'être signalés, ce sont, d'une part l'inefficacité de la *p*-isopropylphényléthylènediamine, d'autre part l'activité trypanocide d'un dérivé du citronellol (2015 F), montrant que la présence d'un noyau benzénique n'est pas indispensable à l'activité thérapeutique de ces composés.

Il est vraisemblable que les exemples rapportés n'ont pas épuisé les propriétés thérapeutiques caractéristiques des dérivés de la benzyléthylènediamine. D'autres recherches, actuellement en cours, fixeront sans doute encore ce point, de même qu'elles préciseront l'étendue de la nouvelle classe de trypanocides décrite dans cette note.

LES VACCINATIONS ANTIRABIKES A L'INSTITUT PASTEUR EN 1942

par R. BÉQUIGNON et CH. VIALA.

Ce rapport, établi suivant le plan fixé par la Conférence internationale de la Rage, concerne l'année 1942.

1° *Personnes traitées* : 435 personnes se sont présentées à la consultation du Service des Vaccinations Antirabiques. Chez 149 le traitement a été jugé nécessaire.

2° *Méthode de traitement* : La méthode employée est la méthode pastorienne (se reporter à ces *Annales*, juin 1941, 66, 483).

*
*
*

Le virus fixe, actuellement utilisé, représentait, le 31 décembre 1942, le 1.711° passage de la souche employée lors de la création du Service des Vaccinations Antirabiques, rue d'Ulm.

*
*
*

3° *Répartition des personnes traitées d'après le territoire sur lequel elles ont été mordues* :

France.	149
-----------------	-----

4° *Répartition des personnes traitées suivant l'animal mordeur* :

Chiens de propriétaires connus	39
Chiens errants	8
Chats de propriétaires connus	17
Chats errants	9
Rats	6

5° *Répartition des personnes traitées d'après les preuves de rage chez l'animal mordeur* :

Catégorie A. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par un examen histologique ou par le développement de la maladie chez des animaux inoculés avec le bulbe.

Catégorie B. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par un examen vétérinaire.

Catégorie C. — L'animal mordeur est suspect de rage.

Catégorie A	0
Catégorie B.	1
Catégorie C.	148

Les névraxes de 38 des animaux mordeurs de la dernière catégorie ont été examinés :

4 examens histologiques des ganglions plexiformes et du cerveau d'animaux mordeurs ont été effectués par les soins du Laboratoire National de Recherches d'Alfort, qui a constaté « une infiltration cellulaire identique à celle du premier stade de la rage ».

34 examens ont été effectués par le Service des Vaccinations Antirabiques. Cinq fois les commémoratifs de la mort de l'animal et le résultat de l'examen histologique du système nerveux nous ont autorisés à interrompre le traitement chez les personnes mordues (V. plus loin, § 10, les principes généraux qui dictent cette décision).

6° *Répartition des personnes traitées d'après les caractères des morsures :*

Profondes	146
Superficielles.	3

7° *Répartition des personnes traitées suivant que les vêtements ont été interposés ou non :*

Peau nue	79
Vêtements interposés	70

8° *Répartition des personnes traitées d'après le siège de la morsure :*

Tête.	11
Membres supérieurs.	74
Tronc.	2
Membres inférieurs	62

9° *Répartition des personnes traitées d'après le nombre de jours écoulés entre la morsure et le traitement :*

0 à 4 jours	100
5 à 7 jours	17
8 à 14 jours	21
15 à 21 jours	7
Plus de 21 jours	4

10° *Autres renseignements :* Pour la formule du traitement et le tableau récapitulatif des résultats généraux des vaccinations depuis l'origine, Cf. ces *Annales*, loc. cit.

Il est indiqué plus haut que les vaccinations ont pu être suspendues cinq fois sur 34 examens histologiques (soit 15 p. 100). Voici les conditions que nous croyons indispensables de réunir pour une décision aussi grave :

1° Les commémoratifs (circonstance de la morsure, symptomatologie de l'animal, absence complète de paralysies) ne sont pas en faveur de la rage ;

2° L'animal a succombé spontanément à l'affection en cause, et sa mort ne résulte d'aucune manœuvre intempestive, ni d'aucun traumatisme ;

3° L'examen histologique du névraxe, pratiqué dans de bonnes conditions (technique de prélèvement, état de conservation et absence d'altérations cadavériques, colorations spéciales), répond aux critères fixés par P. Lépine et V. Sautter (1). Plus particulièrement :

a) L'examen histologique des ganglions de Gasser ne montre ni infiltration cellulaire, ni lésion des cellules ganglionnaires ;

b) L'examen histologique du cerveau est négatif : on ne trouve, notamment, aucune lésion périvasculaire (manchons), aucune infiltration cellulaire, aucune modification, architecturale ni cellulaire, de la corne d'Ammon.

**Répartition par départements des personnes traitées
à l'Institut Pasteur :**

Aisne	1	Manche	1
Ardennes	1	Nièvre	1
Calvados	1	Oise	2
Corrèze	1	Seine { Paris	57
Côtes-du-Nord	1	{ Banlieue	37
Finistère	1	Seine-et-Marne	1
Gironde	1	Seine-et-Oise	16
Ille-et-Vilaine	4	Seine-Inférieure	3
Indre-et-Loire	1	Sèvres (Deux-)	2
Loir-et-Cher	2	Vendée	2
Loire Inférieure	6	Vosges	1
Loiret	1	Yonne	2
Maine-et-Loire	3		

11° *Mesures prises en vue de poursuivre l'évolution des cas traités pendant six mois au maximum :*

Les médecins et les vétérinaires sont priés de nous tenir au courant des accidents qui pourraient se produire pendant les six mois qui suivent le traitement.

12° *Accidents paralytiques :* Néant.

13° *Décès :* Néant.

La statistique pour 1942 est donc ainsi établie :

Personnes traitées	149
Mort	0

(1) P. LÉPINE et V. SAUTTER, *Ann. Inst. Victor-Babès* (Bucarest), 1938, 9, 123.

ASSOCIATION DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15°.)

Séance du 6 mai 1943.

COMMUNICATIONS (SUITE ET FIN)

DU MOMENT OU S'ÉTABLIT CHEZ LE LAPIN L'IMMUNITÉ DU NÉVRAXE A L'ÉGARD DU NEURO-VIRUS VACCINAL

par GASTINEL et R. FASQUELLE.

Dans une note précédente, nous avons montré qu'à partir du quatrième jour après une première insertion virulente cutanée s'établit un état nouveau de réceptivité du tégument et qu'à dater de ce moment le virus ne provoque plus une lésion de vaccine normale, mais se borne à déterminer un processus papulo-érythémateux qui ne s'ulcère pas, analogue à celui qui s'observe avec un vaccin tué chez un lapin immunisé.

Parallèlement, nous avons cherché à préciser le moment où s'installe un état réfractaire du névraxe à l'égard d'un neuro-virus introduit dans le cerveau d'un animal pendant la période d'incubation et d'évolution de sa lésion primo-vaccinale cutanée.

Le neuro-virus utilisé dans nos expériences tue l'animal neuf avec phénomènes d'encéphalite en trois jours.

Ce même neuro-virus reste strictement sans effet sur l'animal antérieurement et dûment immunisé.

Lorsque l'inoculation intracérébrale est faite le huitième jour après la vaccination tégumentaire, l'animal survit et ne présente strictement aucun trouble.

Si ce délai est de six jours seulement, le lapin survit encore, mais toutefois présente une phase de fatigue avec de l'amaigrissement et quelques troubles dyspnéiques éphémères.

Lorsque l'épreuve intracérébrale est faite quatre jours (exactement dans nos protocoles quatre-vingt-dix heures) après l'inoculation sur la peau, c'est-à-dire à un moment où l'éruption commence à peine à se constituer, les manifestations observées sont les suivantes : les

trois premiers jours après l'injection intracérébrale, l'animal va bien et mange ; le quatrième jour apparaît un coryza, bientôt suivi de troubles dyspnéiques, en même temps que l'appétit disparaît ; vingt-quatre heures plus tard, débutent des phénomènes parétiques aux membres inférieurs, s'accompagnant d'incontinence des sphincters ; puis la paralysie s'accroît, semble être ascendante ; la respiration devient irrégulière et la mort survient.

Enfin, si l'on réduit à quarante-huit heures le laps de temps écoulé entre l'insertion cutanée et le test intracérébral, l'inoculation du neuro-virus dans le cerveau entraîne la mort en trois jours, exactement comme chez un animal neuf.

Ajoutons que chez tous les animaux ainsi morts après épreuve intracérébrale, la présence du virus a toujours été décelée dans le cerveau.

Donc, l'apparition de la non-réceptivité du névraxe acquise après insertion sur la peau, se situe entre le quatrième et le sixième jour, mais (et c'est là chose intéressante), elle ne s'installe pas selon la loi du tout ou rien, et déjà quatre-vingt-dix heures après la vaccination tégumentaire existe un état de résistance névraxique cérébrale, qui se juge par une plus lente incubation des accidents et par leur caractère progressif, aboutissant à la mort dans un délai de quatre à six jours à partir du moment où les premiers accidents ont commencé.

(Faculté de Médecine, Laboratoire de Bactériologie.)

RECHERCHES SUR LA STABILITÉ DES LIAISONS ENTRE AGGLUTININES ET BACTÉRIES ESSAIS INFRACTUEUX DE DISSOCIATION DES COMPLEXES ANTIGÈNES-ANTICORPS PAR DES SOLUTIONS D'AMINOACIDES

par MICHEL MACHEBOEUF, MAX VISCONTINI et MARCEL RAYNAUD.

Si les conceptions actuelles sur la constitution des protéides sont exactes, les fonctions chimiques présentes dans une molécule protéidique sont : 1° des fonctions amides constituant la chaîne peptidique fondamentale, certaines de ces fonctions amides pouvant être sous une forme tautomère (théorie cyclol) ; 2° des fonctions très diverses appartenant aux amino-acides indépendamment de leur groupement amino-acide lui-même. Ces fonctions acide, amine, imine, phénol alcool, thiol, carbure, etc., n'interviendraient pas dans l'union des amino-acides entre eux, lors de la formation du protéide, elles seraient donc à peu près telles qu'elles se trouvent dans les amino-acides eux-mêmes lorsqu'ils sont indépendants. Or, on tend à admettre que les anticorps sont des globulines. Les fonctions chimiques de l'anticorps qui jouent un rôle dans l'union avec l'antigène seraient donc à rechercher uniquement parmi celles énumérées ci-dessus. Laissons pour l'instant de côté les fonctions amides sur lesquelles nous espérons revenir dans un autre

travail et envisageons les fonctions diverses appartenant aux radicaux des amino-acides. Si certaines de ces fonctions interviennent dans la liaison antigène-anticorps et si, comme on peut le penser, l'union de chacune de ces fonctions avec la fonction correspondante de l'antigène s'effectue par une réaction réversible, on devrait, en faisant agir un excès des amino-acides qui les supportent, pouvoir dissocier, par action de masse, la combinaison antigène-anticorps, chaque amino-acide tendant à se lier à la fonction correspondante de l'antigène pour déplacer l'anticorps. Dans une note antérieure (1), nous avons montré que le mélange d'amino-acides obtenu par hydrolyse acide de sérum-globuline est incapable de détacher des agglutinines préalablement fixées par des bacilles paratyphiques, mais on sait que l'hydrolyse acide détruit certains amino-acides (tryptophane par exemple), aussi avons-nous poursuivi nos essais en opérant avec des dilutions d'amino-acides purs. Les résultats furent semblables. Les amino-acides n'ont pas dissocié le complexe microbe-agglutinine.

Technique. — Les bacilles (*Paratyphi* A 754) récoltés sur le milieu gélosé, contenu dans une boîte de Roux, sont mis en suspension dans 200 c. c. d'eau salée à 8 p. 1.000, puis on les tue par chauffage pendant une heure à 53° C. On les recueille après centrifugation pour les remettre en suspension dans 150 c. c. d'eau salée. On ajoute la plus petite quantité possible d'antisérum pour que l'agglutination soit totale (de l'ordre de 1 c. c. pour l'antisérum de Cheval utilisé ici). On laisse se faire l'agglutination à 37° C pendant deux heures, puis on centrifuge doucement (1.000 T.M.) pour recueillir les germes agglutinés que l'on lave à deux reprises par de l'eau distillée. (On vérifie que la dernière eau de lavage ne contient pas la moindre trace d'agglutinines.) Des portions aliquotes du culot de centrifugation sont placées dans 10 tubes contenant chacun 5 c. c. d'une solution à 2 p. 1.000 d'un amino-acide différent (lorsque l'amino-acide a une solubilité inférieure à 2 p. 100 [tryptophane, tyrosine], on en met tout de même 2 cg. par centimètre cube de liquide, la solution est saturée et il reste un excès de cristaux non dissous). On laisse en contact pendant vingt-quatre heures à 37° C. Le mélange est alors divisé en deux parts : 1° une part sert à vérifier que les corps microbiens sont toujours sensibilisés. Il suffit pour cela d'ajouter 7 p. 1.000 de sel et l'on voit l'agglutination se produire rapidement ; 2° l'autre part sert à vérifier l'absence d'agglutinines dans le liquide environnant les corps microbiens. Pour cela, on élimine les microbes par centrifugation, puis on soumet le liquide à la dialyse pour éliminer l'amino-acide. Le liquide restant dans le dialyseur est alors additionné de 7 p. 1.000 de NaCl ; il apparaît un très petit précipité dû à l'existence de complexes antigène-anticorps que l'eau distillée avait arrachés aux microbes sensibilisés (2). On élimine ce précipité par centrifugation et l'on met des portions du liquide en contact avec une faible quantité de corps microbiens, en variant les proportions relatives. Il ne se fait jamais aucune agglutination. Si les amino-acides avaient arraché aux microbes sensibilisés une proportion, même très faible, des agglutinines, on constaterait ici une agglutination. Les amino-acides étudiés sont : glycocolle, alanine, lysine, leu-

(1) *Ces Annales*, 1942, 68, 495.

(2) *Ces Annales*, 1942, 68, 553.

cine, isoleucine, arginine, valine, tyrosine, phénylalanine, histidine, tryptophane, oxyproline, acide aspartique et acide glutamique.

Conclusions. — Les amino-acides constitutifs des globulines du sérum ne sont pas capables lorsqu'ils sont libres, de détacher, par action de masse, les agglutinines fixées par des bacilles paratyphiques. Si les agglutinines sont, comme tout semble le prouver, des globulines, les fonctions chimiques de ces globulines qui interviennent dans la liaison avec les antigènes microbiens ne semblent donc pas être uniquement des fonctions appartenant aux radicaux des amino-acides, indépendamment de la chaîne peptidique et ayant conservé intactes leurs réactivités propres, telles qu'elles sont dans les amino-acides libres.

Paraîtra en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* la note suivante :

Etude quantitative de la précipitation de sérums anticharbonneux et normaux par différentes solutions de gélose, par M^{lle} A.-M. STAUB et P. GRABAR.

Séance du 10 juin 1943.

Présidence de M. NOËL BERNARD.

COMMUNICATIONS

RECHERCHES SUR LES ANAÉROBIES DE L'HUITRE

par A.-R. PRÉVOT et M. RAYNAUD.

Ces recherches avaient été entreprises tout d'abord pour essayer de retrouver et d'étudier *I. satellitis* que Loris Melikoff (1) avait isolé en 1913 des selles de typhiques contaminés par l'ingestion d'huîtres ainsi que de 33 p. 100 des huîtres provenant du parc de la Slake. Cet anaérobie en effet n'a jamais été retrouvé depuis cette époque et ne figure dans aucune collection, et il y aurait eu intérêt à l'étudier à nouveau par les techniques modernes, étant donné le rôle pathogène important que lui attribuait L. Melikoff dans la fièvre typhoïde. Des huîtres achetées à Paris (Claires, Marennes, Bellon, Portugaises) ne

(1) Loris MELIKOFF, ces *Annales*, 1913, 27, 541.

renfermaient aucun anaérobie. Nous avons donc fait venir des huîtres de Marseille (Claires parquées à Sète) sur lesquelles nous avons observé les faits suivants : sur 12 huîtres examinées, 6 ne renfermaient pas d'anaérobies (50 p. 100) et 6 autres en contenaient. Chez ces dernières, 7 souches anaérobies ont été isolées, dont 4 souches de *W. perfringens*, 1 souche d'*Inflabilis sanguicole*, 1 souche de *Clostridium septimum*, et une espèce nouvelle : *Inflabilis setiensis* P. et R.

I. Parmi les 4 souches de *W. perfringens* isolées de l'huître, 2 n'étaient pas pathogènes, la troisième l'était très légèrement pour la souris, la quatrième était pathogène pour le cobaye et la souris. Sur les 4 souches, une seule était indologène, tandis qu'une autre produisait une petite quantité de scatol. Nous devons considérer cette souche scatologène comme représentant une variété nouvelle et très rare de *W. perfringens*.

II. La souche HC₁ d'*Inflabilis sanguicole* a été étudiée complètement, et nous a permis de compléter la description sommaire que Vauchez et ses collaborateurs avaient donnée en 1925 de l'unique souche alors connue. C'est un gros bâtonnet immobile, Gram-positif, à spores clostridiennes qui résistent dix minutes à 70°, mais pas à 80°. Il forme des colonies lenticulaires en gélose profonde où quelques bulles de gaz se forment. Le bouillon glucosé est troublé ; la gélatine est liquéfiée, le lait est coagulé. Ni la fibrine, ni le sérum coagulé ne sont attaqués. La phénosafranine, le rouge neutre et la safranine sont réduits. Le nitrate de sodium n'est pas réduit en nitrite. Les glucides suivants sont fermentés : glucose, lévulose, galactose, lactose, maltose, saccharose, arabinose, xylose, amidon.

La fermentation du bouillon VF glucosé à 1 p. 100 donne naissance aux produits terminaux suivants : indol ; SH₂ ; NH₃ (0,03 g. p. 100) ; traces d'amines volatiles ; aldéhydes ; acides valérianique et propionique ($\frac{V}{P} = \frac{3}{20}$) et traces d'acide butyrique ; acide lactique.

Cette souche n'était ni pathogène, ni hémolytique.

III. La souche HJ₁ de *Clostridium septimum* a été également étudiée complètement, ce qui a permis de compléter la description ancienne et très sommaire de von Hibler, cette espèce n'ayant jamais été retrouvée depuis. C'est un gros bâtonnet mobile à spores clostridiennes qui résistent dix minutes à 70° mais pas à 80°. Les colonies en gélose profonde sont ouatées et ne produisent pas de gaz. Il trouble le bouillon glucosé où il forme des zoogléas visqueuses ; il y a production d'odeur fétide. La gélatine est très lentement liquéfiée (vingt jours) et le lait très lentement coagulé (un mois). Le sérum coagulé et la fibrine ne sont pas attaqués. La phénosafranine est réduite, mais pas le rouge neutre ni la safranine. Les glucides suivants sont très faiblement attaqués : glucose, lévulose, galactose, maltose, saccharose, arabinose, xylose, glycérine, dulcité, mannite, amidon et sorbite.

Le nitrate de sodium n'est pas réduit en nitrite.

La fermentation du bouillon VF glucosé à 1 p. 100 produit SH₂, NH₃ (0,15 g. pour 100 c. c.) ; acides volatils : 0,315 g. p. 100, consistant en acides valérianique et acétique ($\frac{V}{A} = \frac{3}{4}$) et une petite quantité d'aldéhyde.

Cette souche n'était pas pathogène pour le cobaye et la souris, mais très légèrement hémolytique pour les globules rouges du mouton.

IV. La souche HD 4 n'étant identifiable à aucune espèce connue a été étudiée complètement ; c'est une espèce nouvelle pour laquelle nous proposons le nom de *Inflabilis setiensis* en raison de sa provenance. Sa description fait l'objet de la note suivante (*).

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

ACTION MÉNAGÉE DE CERTAINS AGENTS CHIMIQUES SUR LE SÉRUM

par D. DERVICHIAN et C. MAGNANT.

La plupart des protéines purifiées et cristallisées couvrent, en s'étalant sur l'eau, une aire de 1 mètre carré par milligramme sous une pression superficielle d'environ 1 dyne/cm. Or, en étalant le sérum total, on trouve que l'aire recouverte n'est seulement que de 0,5 mètre carré environ par milligramme de protéines qu'il contient.

Dans trois communications faites à la Société de Chimie biologique (1, 2, 3) nous avons montré que la dénaturation (sans coagulation) des différentes protéines du sérum améliorait leur étalement et permettait de retrouver la valeur de 1 mètre carré par milligramme. Bien plus, les opérations successives qui servent à la purification des albumines améliorent aussi leur étalement. Nous avions suggéré de mettre cela sur le compte d'une dénaturation ménagée.

Dans le présent travail, nous avons étudié l'action de différents agents chimiques sur le sérum en essayant de suivre par les variations dans l'étalement les altérations plus ou moins ménagées et réversibles qui pouvaient s'ensuivre.

Pour être étalé, le sérum est dilué mille fois. Une première fois, 1 c. c. de sérum est d'abord amené à 100 c. c. dans un flacon jaugé, la dilution étant faite dans la solution de la substance dont on veut étudier l'action à une concentration donnée. Puis 1 c. c. de cette solution de sérum est de nouveau dilué dans un second flacon jaugé de 10 c. c. Cette seconde dilution est faite soit de nouveau dans la même solution de l'agent chimique, soit dans l'eau. Dans ce dernier cas, la concentration finale en produit chimique n'est plus que le 1/10 de celle avec laquelle le sérum a d'abord été en contact. On peut ainsi se rendre compte si l'action est réversible. Afin d'éviter la précipitation des globulines du sérum, les solutions contiennent dans tous les cas 8 p. 1.000 de NaCl. On ajoute également 4 p. 1.000 d'alcool isoamylique pour assurer l'étalement complet des gouttes de solution que l'on

(*) Cette note sera publiée dans le prochain numéro.

(1) D. DERVICHIAN, *Bull. Soc. Chimie biol.*, 1943, 25, 187.

(2) D. DERVICHIAN et J.-J. PÉREZ, *Bull. Soc. Chimie biol.*, 1943, 25, 190.

(3) D. DERVICHIAN et C. MAGNANT, *Bull. Soc. Chimie biol.*, 1943, 25, 192.

dépose à la surface de la cuve (4). Une étude préalable a montré que la présence de cet alcool est sans action sur les protéines.

Action du dioxane (5). — Les résultats les plus nets nous ont été donnés par le dioxane agissant sur un sérum de bœuf. Dilué mille fois dans une solution de dioxane à 25 p. 100, le sérum couvre une aire deux fois plus grande que le témoin. C'est là l'effet maximum, mais l'action se manifeste dès 2 p. 100. L'accroissement de l'aire est d'environ 4/10 avec la solution de dioxane à 4 p. 100 ; il est d'environ 5/10 entre 10 et 15 p. 100, puis monte régulièrement vers le maximum à 25 p. 100. Pour des concentrations supérieures, l'étalement diminue, tout en dépassant de 2/10 celui du témoin, même lorsque l'on atteint la concentration de 50 p. 100 en dioxane. Il y a vraisemblablement superposition de deux effets : d'une part amélioration de l'étalement par suite d'une dénaturation, ou du moins d'une transformation ménagée et, d'autre part, coagulation d'une partie des protéines tendant à diminuer l'étalement. Les effets observés restent les mêmes, que le contact soit de cinq minutes ou d'une demi-heure.

Réversibilité. — Si la transformation observée était réversible, l'aire recouverte ne devrait dépendre que de la concentration finale en dioxane de la solution, quelle qu'ait été préalablement cette concentration. Ceci semble ne se vérifier que tant qu'elle n'a pas dépassé 10 p. 100 lors de la première dilution. Mais si la solution finale contenant 2 p. 100 de dioxane a été obtenue en passant par une première dilution à 20 p. 100 de dioxane par exemple, l'accroissement dans l'étalement, bien que plus faible qu'avec une concentration finale de 20 p. 100, sera plus fort que celui que l'on obtient en procédant à toutes les opérations de la dilution avec des solutions de dioxane à 2 p. 100 seulement.

Action de l'urée. — Avec ce corps, on n'observe aucun accroissement dans l'étalement au-dessous d'une concentration de 5 p. 100. Mais à 10 p. 100 il y a un accroissement de 2/10 et, aux environs de 20 p. 100, un maximum atteignant 4/10. La réversibilité serait plus complète que dans le cas du dioxane.

La formamide, le sulfate d'ortho-oxyquinoléine et le formol ont provoqué aussi des accroissements dans l'étalement. Par contre, l'alcool éthylique et l'acétone ne modifient pas l'étalement, même à des concentrations allant jusqu'à 20 p. 100. Mais on pourrait objecter que leur action est peut-être masquée par une coagulation partielle invisible à cette dilution du sérum qui compenserait exactement l'effet produit sur le restant des protéines.

(Institut Pasteur, Service de Chimie Physique.)

(4) D. DERVICHIAN, *Nature*, 1939, 144, 629 et *J. Chimie phys.*, 1940, 37, 118.

(5) L'idée d'utiliser le dioxane nous a été suggérée par M. J. Loiseleur.

LYSE BACTÉRIENNE PROVOQUÉE PAR UNE SOUCHE DE *B. COLI*

par A. GUELIN.

L'action inhibitrice du *B. coli* sur la croissance de différents microbes a été signalée par Wathelet (1), Conradi et Kurpjuweit (2), Nissle (3), Gratia (4), Gundel (5), Schilling et Califano (6), Koch et Kraemer (7), Gundel et Kliewe (8), Dmitrowskaya et Tchebotarewskaya (9).

La plupart des auteurs ont admis la présence dans la culture de *B. coli* d'une substance thermolabile, retenue par la bougie et qui inhibe le développement microbien. Ces auteurs, ayant pour la plupart travaillé avec des cultures non filtrées, l'existence de la substance inhibitrice restait douteuse. En 1925, Gratia a décrit une souche de *B. coli* dont le filtrat, résistant à 120°, empêchait la croissance d'une autre souche de *B. coli*. En 1930, Schilling et Califano ont réussi à obtenir un filtrat de *B. coli* actif sur le *B. Shiga*. Enfin Gundel a extrait d'une culture de *B. coli* un lipoïde à action lytique, thermo-résistant, auquel il attribuait en partie l'action antagoniste de ce germe.

On sait que l'antagonisme microbien peut se manifester par la lyse d'un germe en présence d'un autre. Au cours de nos recherches nous avons constaté la lyse de *B. coli* Bordet et de *B. paradysentérique* Y 6 R, provoquée par une souche de *B. coli* 36 (F.-M. Burnet). La lyse s'observe sur gélose, à condition qu'on laisse intervenir le *B. coli* 36 au début du développement du microbe sensible au cours des deux premières heures environ. Les colonies de *B. coli* 36 s'entourent d'une zone de lyse, qui se forme aux dépens de la nappe du germe sensible. On peut donc distinguer deux phases : 1° le début de développement des deux microbes ; 2° la lyse du microbe sensible sous l'influence de microbe antagoniste. Il faut noter la rapidité de la croissance de *B. coli*, par rapport à celle des germes sensibles. Dès 1905, Conradi et Krupjuweit ont remarqué, du reste, que le pouvoir inhibiteur d'une souche de *B. coli* est d'autant plus grand que sa croissance est plus rapide.

Sur gélose décalcifiée par l'oxalate, la lyse ne se produit pas.

Le phénomène est spécifique, puisque la lyse ne s'observe qu'avec certains germes. Les résultats furent négatifs avec 4 souches de *B. coli* (Lewis, Bruxelles, St, Sh), un *B. typhique* (Lister), un *B. paraty-*

(1) WATHELET, ces Annales, 1895, 9, 252.

(2) CONRADI et KURPJUWEIT, *Wien. med. Wochenschr.*, 1905.

(3) NISSELE, *Deutsche med. Wochenschr.*, 1916, 1180.

(4) A. GRATIA, *C. R. Soc. Biol.*, 1925, 93, 1040.

(5) GUNDEL, *Zentralbl. Bakt.*, 1930, 116, 81.

(6) SCHILLING et CALIFANO, *Zentralbl. Bakt.*, 1930, 119, 244.

(7) KOCH et KRAEMER, *Zentralbl. Bakt.*, 1932, 123, 308.

(8) GUNDEL et KLIEWE, *Zentralbl. Bakt.*, 1932, 124, 519.

(9) DMITREWSKAYA et TCHEBOTAREWSKAYA, *Arch. Sc. Biol.* (russe), 1936, 43, 344.

phique A (Kaufmann), un *B. paratyphique* B (Rouland), un *B. Shiga*, un *B. subtilis* W, un staphylocoque Ew.

Le filtrat de culture en bouillon de *B. coli* 36 renferme la substance active que nous désignons provisoirement par le signe L-36. La substance L-36 est décelée en déposant 1 goutte de filtrat sur la suspension microbienne préalablement étalée sur gélose. Après quelques heures d'étuve, la couche de microbe légèrement développée sur toute la surface de la gélose, commence à s'éclaircir, à la place où la goutte avait été déposée, et au bout de quelque temps nous avons une tache transparente au milieu d'une couche uniforme.

Les dilutions croissantes de L-36 peuvent donner des taches de lyse, mais les cultures secondaires repoussent d'autant plus vite et abondamment que la dilution est plus forte. Les colonies isolées sur ces taches de lyse donnent des souches résistantes au L-36, mais non au bactériophage du *B. coli* 36. Par contre, la souche résistante au bactériophage 36, résiste au L-36. Cela s'explique probablement par la présence de corps microbiens lysés de *B. coli* 36 dans le filtrat bactériologique.

L-36 est actif sur *B. coli* Bordet et *B. paratyphique* Y 6 R, à condition toujours d'être mis en contact pendant les six premières heures de leur développement, comme c'est le cas pour le bactériophage. Les cultures de cinq heures d'étuve, traitées par le chloroforme ou par le chauffage à 60° ne sont plus lysables par L-36.

L'action de L-36 ne s'étend qu'aux souches sensibles à l'action du *coli* 36 lui-même. Elle n'est pas neutralisée par le sérum antibactériophage 36.

L'absence de Ca n'empêche nullement l'action de cette substance, contrairement à ce qu'on observe avec la souche elle-même. Les ions de Ca, nécessaires pour la formation de la substance active, ne sont pas indispensables une fois cette substance formée.

Nous ne pouvons pas encore nous prononcer sur la nature et le mécanisme du phénomène décrit, son étude chimique et biologique étant en cours. Mais dès maintenant on peut dire qu'il ne s'agit ni de bactériophage (le phénomène n'étant pas transmissible), ni d'une diastase, étant donné la thermo-résistance élevée de la substance active.

Le fait que seules sont atteintes les cultures très jeunes et en pleine croissance, est à rapprocher des constatations de E. Wollman (10) relatives à l'autolyse sous l'action des antiseptiques.

Il semble que dans nos expériences non plus il ne s'agisse pas de lyse à proprement parler par le *coli* antagoniste, mais plutôt d'autolyse des germes sensibles, sous l'influence d'une certaine substance élaborée par le *B. coli* 36.

Les faits observés par nous rappellent ceux décrits par Gratia (filtrabilité, thermo-résistance, formation d'une culture résistante), avec cette différence qu'au lieu de l'action inhibitrice décrite par cet auteur, le filtrat obtenu par nous provoque la lyse des cellules déjà développées.

Conclusion. — 1° le *B. coli* 36 provoque la lyse du *B. paratyphique* Y 6 R et du *B. coli* Bordet ; 2° le filtrat de culture en bouillon du *B. coli* 36 renferme la substance active de ce microbe ; 3° Cette substance est thermo-résistante, spécifique, et n'est pas transmissible.

Son activité s'exerce seulement sur les germes vivants, au début de leur développement ; 4° Dans les milieux privés de Ca, il n'y a pas de formation de substance active. Mais une fois formée, celle-ci peut exercer son activité en absence de Ca ; 5° il ne s'agit ni d'un bactériophage, ni d'une diastase. L'étude chimique et biologique de la substance active est en cours.

Paraîtront en *Mémoires* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* les communications suivantes présentées à la séance du 10 juin :

La vaccination antituberculeuse par les voies respiratoires. Aérosols et brouillards de BCG, par J. TROISIER, J. LE MELLE-TIER et J. SIFFERLEN.

Recherches sur l'état des esters de cholestérol et des phosphatides dans le sérum sanguin. Etudes sur l'homogénéité des cénapses phosphatido-stéridoprotéidiques par ultracentrifugation et par électrophorèse, par M. MACHEBOEUF, J.-L. DELSAL, P. LÉPINE et J. GIUNTINI.

Recherches immunochimiques sur la bactériodie charbonneuse. I. Le liquide d'œdème du cobaye et les polysides, par M^{lle} A.-M. STAUB et P. GRABAR.

Recherches immunochimiques sur la bactériodie charbonneuse. II. Les fractions protéidiques, par P. GRABAR et M^{lle} A.-M. STAUB.

Le Gérant : G. MASSON.